

XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL



ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL (XI CONONERA)

11ª EDIÇÃO

Organizadores dos Anais

Ana Kelen Felipe Lima

Lucas Jacomini Abud

Lawrence de Oliveira Barros

Francisca Elda Ferreira Dias

Cleudson Manoel Gomes da Silva

Maria de Jesus Veloso Soares

Marcos Rodrigues da Silva



XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL



ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL (XI CONERA)

11ª EDIÇÃO

Organizadores dos Anais

Ana Kelen Felipe Lima

Lucas Jacomini Abud

Lawrence de Oliveira Barros

Francisca Elda Ferreira Dias

Cleudson Manoel Gomes da Silva

Maria de Jesus Veloso Soares

Marcos Rodrigues da Silva





XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Organizadores dos Anais

Ana Kelen Felipe Lima

Lucas Jacomini Abud

Lawrence de Oliveira Barros

Francisca Elda Ferreira Dias

Cleudson Manoel Gomes da Silva

Maria de Jesus Veloso Soares

Marcos Rodrigues da Silva

Anais do XI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (XI CONERA)



Araguaína – TO

2024



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

©2024 by Wissen Editora
Copyright © Wissen Editora
Copyright do texto © 2023 Os autores
Copyright da edição © Wissen Editora
Todos os direitos reservados

Direitos para esta edição cedidos pelos autores à Wissen Editora.



Todo o conteúdo desta obra, inclusive correção ortográfica e gramatical, é de responsabilidade do(s) autor(es). A obra de acesso aberto (Open Access) está protegida por Lei, sob Licença Creative Commons Atribuição-Não Comercial-Sem Derivações 4.0 Internacional, sendo permitido seu *download* e compartilhamento, desde que atribuído o crédito aos autores, sem alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Editores Chefe: Dra. Adriana de Sousa Lima
Me. Junielson Soares da Silva
Ma. Neyla Cristiane Rodrigues de Oliveira

Projeto Gráfico e Diagramação: Ana Beatriz de Medeiros Melo

Imagem da Capa: Ana Beatriz de Medeiros Melo

Edição de Arte: Ana Beatriz de Medeiros Melo

Revisão: Os autores

Informações sobre a Editora

Wissen Editora

Homepage: www.editorawissen.com.br

Teresina - Piauí, Brasil

E-mails: contato@wisseneditora.com.br

wisseneditora@gmail.com

Siga nossas redes sociais:



@wisseneditora



2024



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Anais do XI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (XI CONERA)

 <https://www.doi.org/10.52832/wed.110>

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)

Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (11.: 17-19 nov. 2022: Araguaína, TO)
Anais do XI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (XI CONERA) [livro
eletrônico]. --11. ed. -- Araguaína, TO: Wissen Editora, 2024.

PDF

Vários colaboradores.

Bibliografia.

ISBN: 978-65-85923-16-3

DOI: 10.52832/wed.110

1. Medicina - Congressos 2. Medicina veterinária 3. Reprodução animal I. Título

CDD-636.089

24-213783

NLM-SF-745

Índices para catálogo sistemático:

1. Medicina veterinária 636.089

Eliane de Freitas Leite - Bibliotecária - CRB 8/8415

Informações sobre da Wissen Editora

Homepage: www.editorawissen.com.br

Teresina - Piauí, Brasil

E-mails: contato@wisseneditora.com.br

wisseneditora@gmail.com

Como citar: LIMA, A. K. L.; *et al.* Anais do XI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (XI CONERA), 1., 2024, [Online]. **Anais** [...]. 11. ed. Araguaína, TO: Wissen Editora, 2024. DOI:





XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

Anais do XI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (XI CONERA)

REALIZAÇÃO:



Airton Sieben –Reitor

Nataniel da Vera Cruz G. Araújo –Vice-Reitor

Rejane Cleide Medeiros de Almeida - Pró-Reitoria de Extensão

Rômulo Augusto C. Rizzardo – Diretor do Centro de Ciências Agrárias

Laiane Teixeira Sousa Moura – Coordenadora do Curso de Medicina Veterinária

APOIO:





XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

ORGANIZADORES CONERA 2022

Ana Kelen Felipe Lima

Lucas Jacomini Abud

Lawrence de Oliveira Barros

Francisca Elda Ferreira Dias

Cleidson Manoel Gomes da Silva

Maria de Jesus Veloso Soares

Marcos Rodrigues da Silva

Coordenadores gerais

Ana Kelen Felipe Lima

Lucas Jacomini Abud

Vice-coordenador

Lawrence de Oliveira Barros

Comissão organizadora

Aline Nascimento de Moraes

Ana Beatriz Saldanha Moraes

Ana Carolina da Silva Barbosa de Assis

Ana Clara Rodrigues Borges

Ana Kelen Felipe Lima

Bárbara Cristina Martins

Cleidson Manoel Gomes da Silva

Fernanda de Matos Adão

Francisca Elda Ferreira Dias

Geovanna Emilly Carvalho

Gisele Ramos da Silva

Greyce Joveli

Iasmim Pacheco Rocha

Ilgner Aimar Bezerra Pinheiro

Jessica Lima dos Santos

Kariny Santos Ribeiro

Lawrence de Oliveira Barros

Leticia Vasconcelos Barbosa Sousa

Lucas Jacomini Abud

Luís Filipe Araújo de Souza

Marcos Rodrigues da Silva

Maria de Jesus Veloso Soares

Mateus Marques Maciel

Mikaele Correia Machado



Mirelle de Moraes Pereira
Nathalia Lemes dos Santos Lima
Pedro Lucas Gois de Oliveira Minuci
Rafael de Oliveira Rigamonti
Samuel Araújo Lima

COMITÊ TÉCNICO-CIENTÍFICO

Francisca Elda Ferreira Dias - Presidente
Cleudson Manoel Gomes da Silva – Presidente

Revisores de resumos científicos

Msc. Samara Dias Cardoso Rodrigues
Dr. Leandro Rodello FACIT
Dra. Laritza Ferreira de Lima UECE
MSc. André Cascalho Andrade UNIFESSPA
Msc. Onadir Geraldo de Jesus Junior
Prof. Dr. Bruno Moura Monteiro UFRA
Prof. Dr. Cleudson Manoel Gomes da Silva UNIFESSPA
Prof. Dr. Diógenes Henrique de Siqueira Silva UNIFESSPA
Prof. Dr. Eduardo Melo Nascimento UFOB
Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova UFNT
Prof. Dr. Jonahtan Chaves Melo UNIFESSPA
Prof. Dr. Lucas Jacomini Abud UNIFESSPA
Prof. Dr. Márcio Gianordoli Teixeira Gomes UFNT
Prof. Dr. Marco Augusto Giannoccaro da Silva UFNT
Prof. Dr. Moisés dos Santos Miranda UFPA
Prof. Dr. Oscar Oliveira Brasil IFCE
Prof. Dr. Pedro Ancelmo Nunes Ermita UNIFESSPA
Prof. Dra. Aline Alberti Morgado UFNT
Prof. Dra. Ana Kelen Felipe Lima UFNT
Prof. Dra. Ana Luiza Silva Guimarães CEULP ULBRA
Prof. Dra. Ana Paula Gering UFNT
Prof. Dra. Andréa Cintra Bastos Tôrres Passos UFNT
Prof. Dra. Camila Arrivabene Neves UFPI
Prof. Dra. Cristiane Lopes Mazzinghy FACIT
Prof. Dra. Fernanda Luz Alves Neves FACIT
Prof. Dra. Francisca Elda Ferreira Dias UFNT
Prof. Dra. Liliane Moreira Silva Gomes UNIFESSPA
Prof. Dra. Luciana Rocha Faustino UFDPAr
Prof. Dra. Mabel Freitas Cordeiro UNIVASF
Prof. Dra. Maria de Jesus Veloso Soares UFNT



Prof. Dra. Mônica Arrivabene UFPI
Prof. Dra. Priscilla Macedo de Souza UFNT
Prof. Dra. Saura Nayane de Souza UNIFESSPA
Prof. Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante UFPI

Avaliadoras de apresentações orais

Eliane Vianna da Costa e Silva
Maria Isabel Mello Martins

PROGRAMAÇÃO XI CONERA 2022

MANHÃ – 17/11 – QUINTA-FEIRA

ABERTURA	8:15	Lucas Abud e Ana Kelen Felipe
Pietro Baruselli	08:45	Fatores de risco que interferem na eficiência da IATF em fêmeas de corte
Ivo Pivato	9:45	Perdas embrionárias em bovinos

TARDE – 17/11 – QUINTA-FEIRA

Alexandre RossettoGarci	14:00	Uso de sistemas ILPF para elevar o conforto e a eficiência reprodutiva de bovídeos criado a pasto	Bovino
Alexandra Soares Rodrigues	14:45	Estratégias para otimizar a eficiência da IATF em bovinos de corte	Bovino
José NeumanMiranda Silva	15:30	Alternativas alimentares para a obtenção de precocidade sexual em fêmeas zebuínas	Bovino

Gabriela LibertianoLima	14:00	Criopreservação de Oocistos como Alternativa na Preservação de espécies selvagens	Silvestre
Alexandre Rodrigues Silva	14:45	Criopreservação de tecidos gonadais como alternativas para a formação de biobancos para espécies silvestres – estado da arte	Silvestre
Herlon Victor Rodrigues Silva	15:30	Biotécnicas reprodutivas em carnívoros selvagens	Silvestre

MANHÃ – 18/11 – SEXTA-FEIRA



Eliane Vianna da Costa e Silva	8:00	Andrologia na bovinocultura e produtividade em sistema sustentável
Maria Isabel Mello Martins	9:00	Castração química em felinos
Apresentação de Trabalhos	10:30 as 11:30	

TARDE – 18/11 – SEXTA-FEIRA

Fernanda Carlini	14:00	Sazonalidades em equinos em condições brasileiras	Equino
Lawrence de Oliveira Barros	15:30	Uso de Ozonioterapia no Tratamento de endometrites em éguas	Equino

Carlos Consentini	14:00	Qual é a vaca de Altaeficiência Reprodutiva no Rebanho Leiteiro?	Bovino
Haroldo Ribeiro	14:45	Aspectos reprodutivos de bubalinos criados extensivamente em áreas alagadas na Amazônia	Bubalino
Onadir Geraldo de Jesus Junior	15:30	Qual a melhor estratégia para viabilidade da pecuária de cria?	Bovino

Ticiano Franco Pereira Silva	14:00	Gatos para além do trabalho: a evolução das técnicas reprodutivas na espécie	PET
Rita de Cassia Soares Cardoso	14:45	Biotécnicas reprodutivas em cães: o quanto evoluímos até hoje?	PET
Lúcia Daniel Machado da Silva	15:30	Conservação testicular em cães egatos	PET

Sheyla Farhayldes Souza Domingues	14:00	Avanços e fatores limitantes no desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida em primatas neotropicais	Silvestre
Danusa Leite Leão	14:45	Desafios da Manipulação de sêmen de primatas Neotropicais da Família Cebidae	Silvestre
Frederico Ozanan Barros Monteiro	15:30	Desenvolvimento ósseo pré-natal em espécies precociais	Silvestre

Vanessa Porto Machado	14:00	Sarau da Reprodução	Ovino e caprino
Ney Rômulo de Oliveira Paula	14:45	Produção in vitro de embriões caprinos e ovinos: atualidades e perspectivas	Ovino e caprino



Rodrigo Freitas Bittencour	15:30	Biotecnologias reprodutivas do macho e a importância para o melhoramento genético e conservação das espécies	Ovino e caprino
-------------------------------	-------	--	-----------------

MANHÃ – 19/11 – Sábado

Rodrigo Arruda de Oliveira	8:00	Criopreservação de sêmen equino: do passado ao presente
José Ferreira Nunes	8:45	Utilização da Água de coco em pó como diluente de sêmen
José Ricardo de Figueiredo	09:30	Foliculogênese in vitro: Avanços e perspectiva da tecnologia do ovário artificial em ruminantes

TARDE – 19/11 – SABADO

Rinaldo Batista Viana	14:00	Enfermidades da vaca prenhe e parturiente	Bovino
Juliano Franco	14:45	Produção in vitro de embriões, bovinos como ferramenta para o melhoramento genético	Bovino
Luiz Francisco Machado Pfeifer	15:30	Impacto da saúde uterina em programas intensivos de IATF	Bovino

Daniel Couto Uchoa	14:00	Cuidados com a mãe e os neonatos	PET
Camila Louise Ackermann	14:45	Assistência neonatal em partos Normais de Gatas; Primeiros cuidados e recomendações aos tutores	PET

Diogenes Henrique de Siqueira Silva	14:00	O uso de biotecnologias para a reprodução sustentável de peixes	PEIXE
Luciana Ganeno	14:45	Contribuição da empresa pesca e agricultura para a reprodução, conservação e melhoramento genético de peixes Nativos	PEIXE
Carmina Sandra Brito Salmito-Vanderley	15:30	Reprodução assistida em peixes de água doce	PEIXE

ENCERRAMENTO 16:50



SUMÁRIO

RELATO DE CASO	7
ABSCESSO PREPUCIAL EM BOVINO – RELATO DE CASO	8
Beatriz Vanderlei RIBEIRO ^{1*} ; Vitor Hugo Alves RIBEIRO ¹ ; Carlos Daniel Pereira dos SANTOS ¹ ; Andréia da Silva PEREIRA ¹ ; Henrique dos Anjos BOMJARDIM ¹ ; Cleidson Manoel Gomes da SILVA ⁶ .	8
ADENOCARCINOMA UTERINO ASSOCIADO À HIPERPLASIA ENDOMETRIAL CÍSTICA E LEIOMIOMA VAGINAL EM CADELA – RELATO DE CASO	14
Mateus Martins Rodrigues dos SANTOS ^{1*} ; Isabella De Matos Brandão CARNEIRO ² ; Rodrigo Freitas BITTENCOURT ³ ; Gleice Mendes XAVIER; Eduardo Oliveira COSTA; Roberta Ferreira BORGES; Amanda Íris dos Santos CORREIA; Thamys COSTA	14
ADENOMA MAMÁRIO DE FELINO MACHO - RELATO DE CASO	19
Karina Emily Vieira dos SANTOS ^{1*} ; Larissa Cristina Uchôa da COSTA ¹ ; Andreza Soares CARDOSO ¹ ; Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO ¹ ; Saulo Autran Moura PALHA ¹ ; Sebastião Tavares ROLIM FILHO ² ; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO ²	19
ARTRITE SÉPTICA SECUNDÁRIA A FERIDA TRAUMÁTICA EM POTRA MAMANDO – RELATO DE CASO	24
Isadora Luisa Menegucci SCAHETTI ^{1*} ; Aluisio BUENO ^{2**} ; Fernanda Carlini Cunha dos SANTOS ^{3***}	24
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM PREPÚCIO DE EQUINO IDOSO – RELATO DE CASO	29
Fernanda Carlini Cunha dos SANTOS ^{1*} ; Eduardo Rebelato SAKIS ² ; Géssica Luiza Scariot ² ; Maurício Adan NAEHER ³ ; Carlos BONDAN ⁴ ; Leonardo Porto ALVES ^{2**}	29
CRIPTORQUIDISMO BILATERAL EM SUÍNO (<i>S. domesticus</i>) – RELATO DE CASO	34
Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO ^{1*} ; Saulo Autran Moura PALHA ¹ ; Ayla Pereira OLIVEIRA ¹ ; Karina Emily Vieira dos SANTOS ¹ ; Renzo Brito LOBATO ¹ ; Lana Caroline da Costa CARDOSO ² ; Sebastião Tavares Rolim FILHO ³ ; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO ³	34
HAMARTOMA VASCULAR OVARIANO EM CADELA: RELATO DE CASO	40
Amanda Íris dos santos CORREIA ^{1*} ; Gleice Mendes XAVIER ¹ ; Rodrigo Freitas BITTENCOURT ¹ ; Marcus Vinicius Galvão LOIOLA ¹ ; Lara Mariane Rios BARBOSA ¹ ; Eduardo Oliveira COSTA ¹ ; Isabella de Matos Brandão CARNEIRO ¹ ; Mirella S MIRANDA ¹ .	40
HEMANGIOSSARCOMA MAMÁRIO EM CADELA: RELATO DE CASO	46
Amanda Feitosa da CONCEIÇÃO ^{1*} ; Fábio samy Oliveira de SOUSA ² ; Juliana Vasconcelos FIGEIREDO ³ ; Karina Emily Vieira dos SANTOS ⁴ ; Saulo Autran Moura PALHA ⁵ ; Renzo Brito LOBATO ⁶ ; Haroldo Francisco RIBEIRO ⁷ ; Sebastião Tavares Rolim FILHO ⁸ .	46



INFECÇÃO NO TRATO URINÁRIO (PRÓSTATA) DE UM CANINO COM A PRESENÇA DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Proteus spp.</i>: RELATO DE CASO	51
Beatriz Rosa SILVA ^{1*} ; Lana Caroline da Costa CARDOSO ¹ ; Andressa Letícia Rocha BRANCO ¹ ; Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO ² ; Karina Emily Vieira dos SANTOS ² ; Saulo Autran Moura PALHA ² ; Sebastião Tavares Rolim FILHO ³ ; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO ³	51
LEIOMIOMA VAGINAL EM CADELA: RELATO DE CASO	56
Beatriz de Oliveira RAMOS ^{1*} ; Jordana Brites JERONIMO ¹ ; Luis Hiago Coutinho MARQUES ² ; Ádila Rosa Corsini SOUZA ² ; Luan Junio WUTKE ² ; João Victor de Andrade ALVES ¹ ; Márcia Rezende FAES ³ ; Isabel Candia Nunes da CUNHA ⁴ .	56
MUCOMETRA EM CADELA POODLE EM SOBRAL-CE: RELATO DE CASO	61
Maria Janiele SANTANA ¹ ; Francisco Hélio Pontes FILHO ¹ ; Antonio Renilson Sousa VIEIRA ² ; Carlos Henrique Sousa de MELO ³ ; Livia Correia MAGALHÃES ³ ; Kassiana Adriano Pinto de OLIVEIRA ³ ; Wilder Hernando Ortiz VEGA ³ Celso Henrique Souza Costa BARROS ³	61
MUMIFICAÇÃO FETAL EM CADELA: RELATO DE CASO	66
Maria Antônia Moreira MACIEL ^{1*} ; Jeicielly Oliveira SANTOS ¹ ; Alexandra Soares RODRIGUES ¹ ; Deusdete Conceição GOMES JÚNIOR ¹	66
MUMIFICAÇÃO FETAL EM GESTAÇÃO GEMELAR EM EQUINO (RELATO DE CASO)	72
Thayná Santiago de SOUZA ^{1*} ; João Carlos da Silva CARNEIRO ² ; Marcus Vinicius Oliveira GONÇALVES ³ ; Rodrigo de Souza AMARAL ⁴	72
MUMIFICAÇÃO FETAL EM OVELHA: RELATO DE CASO	77
Francisco Welbste Rodrigues COSTA ^{1*} ; José Janieliano Sousa MOTA ² ; Antonio Renilson Sousa VIEIRA ² ; Carlos Henrique Sousa de MELO ³ ; Celso Henrique Souza Costa BARROS ³ ; Livia Correia MAGALHÃES ³ ; Wilder Hernando Ortiz VEGA ³	77
PARTO DISTÓCICO ASSOCIADO A RUPTURA UTERINA E MORTE FETAL EM CADELA - RELATO DE CASO	83
Ilgner Aimar Bezerra PINHEIRO ¹ ; Daiane Michele FRANTZ ² ; Flávia Augusta de OLIVEIRA ² ; Leonardo Vaz BURNS ² ; Rafael de Oliveira RIGAMONTI ³ ; Beatriz Alves Torres GOMES ² ; Pedro Lucas Góis de Oliveira MINUCI ¹	83
PIOMETRA E LEIOMIOSSARCOMA DIFERENCIADO UTERINO EM CADELA: RELATO DE CASO	88
Beatriz de Oliveira RAMOS ^{1*} ; Jordana Brites JERONIMO ¹ ; Luis Hiago Coutinho MARQUES ² ; Ádila Rosa Corsini SOUZA ² ; Luan Junio WUTKE ² ; João Victor de Andrade ALVES ¹ ; Márcia Rezende FAES ³ ; Isabel Candia Nunes da CUNHA ⁴	88
POSTIOPLASTIA PARA CORREÇÃO DE ESTENOSE DO ÓSTIO E MUCOSA PREPUCIAL CONGÊNITA EM UM FELINO DE 10 MESES: RELATO DE CASO	93



Thamys COSTA^{1*}; Gleice Mendes XAVIER¹; Rodrigo Freitas BITTENCOURT¹; Lara Mariane Rios BARBOSA¹; Eduardo Oliveira COSTA¹; Mateus Martins Rodrigues dos SANTOS¹; Isabella de Matos Brandão CARNEIRO¹; Mirella da Silva MIRANDA¹ 93

PRESENÇA DE FETO MUMIFICADO NA CAVIDADE ABDOMINAL DE FELINO: RELATO DE CASO 98

Lana Caroline da Costa CARDOSO^{1*}; Andressa Letícia Rocha BRANCO¹; João Marcelo de Sousa SOARES¹; Yan Luís Brito Matni MONTE¹; Bianca Silva de AGUIAR²; Letícia da Silva RAIOL²; Sebastião Tavares Rolim FILHO³; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO³ 98

PROLAPSO VAGINAL EM VACA DA RAÇA GIR - RELATO DE CASO 104

Luyd Otávio Amaral de CARVALHO¹; Amanda Feitosa da CONCEIÇÃO²; Beatriz Lima GUERREIRO²; Beatriz Rosa SILVA²; Carlos Eduardo Nery Costa DINIZ²; Vinícius Daniel Cunha AMARAL²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO²; Sebastião Tavares Rolim FILHO² 104

TECOMA EM UMA ÉGUA IDOSA DA RAÇA CRIOLA - RELATO DE CASO 109

Fernanda Carlini Cunha dos SANTOS^{1*}; Fernanda Aquino FRANCO²; Thaisi PIAZZA²; Carlos BONDAN³; Leonardo Porto ALVES^{4**} 109

TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL EM CÓRNEA E PREPÚCIO: RELATO DE CASO 113

Beatriz de Oliveira RAMOS^{1*}; Jordana Brites JERONIMO¹; Luis Hiago Coutinho MARQUES²; Ádila Rosa Corsini SOUZA²; Luan Junio WUTKE²; João Victor de Andrade ALVES¹; Márcia Rezende FAES³; Isabel Candia Nunes da CUNHA⁴ 113

USO DE AGLEPRISTONE EM HIPERPLASIA MAMÁRIA FELINA (HMF) APÓS PROCEDIMENTO DE CASTRAÇÃO: RELATO DE CASO 117

Beatriz Lima GUERREIRO^{1*}; Beatriz Rosa SILVA¹; Lana Caroline da Costa CARDOSO¹; Luyd Otávio Amaral de CARVALHO¹; Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO²; Karina Emily Vieira dos SANTOS²; Saulo Autran Moura PALHA²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO³ 117

PESQUISA CIENTÍFICA 123

ADIÇÃO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA ANTICONGELANTE E GLICOSAMINOGLICANOS DA PELE DE TILÁPIA NO MEIO CRIOPROTETOR DO SÊMEN DE CURIMATÁ (*Prochilodus brevis*) 124

Yasmim Maia FERREIRA¹; Vanessa Alves PEREIRA²; Yara Silvino SALES¹; Kamila Teixeira DE PAULA¹; Carla Pamela Braga GUIA¹; Marcos Luiz da Silva APOLIANO³; José Ariévilto Gurgel RODRIGUES³; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY¹ 124

ANÁLISE DA CAPACIDADE LIGANTE DE ESPERMATOZOIDES CANINOS CRIOPRESERVADOS UTILIZANDO DILUENTE COMERCIAL INRA-96 ® 130

Yuri Gonçalves MATOS^{1*}; Tayná Moura MATOS¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Ana Glória PEREIRA¹; Luana Grasielle PEREIRA¹; Romário Parente dos SANTOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹ 130



ANÁLISE DA OSMOLARIDADE DA FRAÇÃO LÍQUIDA DO SÊMEN DE MACACO-DE-CHEIRO (<i>Saimiri collinsi</i> Osgood, 1916)	136
Airton Renan Bastos SOARES ^{1,2*} ; Danuza Leite LEÃO ^{1,3} ; Karol Guimarães OLIVEIRA ⁴ ; Mateus de Souza GALVÃO ⁴ ; Aline Amaral IMBELONI ⁴ ; Rafael dos Santos de ANDRADE ⁴ ; Helder Lima de QUEIROZ ³ ; Sheyla Farhayldes Souza DOMINGUES ^{1,2}	136
ANÁLISE DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> COM SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA	142
Paula Sabrina Arruda COELHO ¹ ; Izamara do Socorro Ramos RODRIGUES ¹ ; Luciano Cruz PANTOJA ^{1,2} ; Maykon Damasceno SILVA ^{1,3} ; Hamilton Silva do NASCIMENTO ^{1,2} ; Alysso Jorge de Oliveira SOUSA ^{1,2,3} ; Moysés dos Santos MIRANDA ^{1,2}	142
ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DO QUATI (<i>Nasua nasua</i>, Linnaeus 1766)	148
Barbara Cristina Martins MOURA; Isadora Oliveira de CARVALHO ³ ; Francisco Antônio Félix XAVIER JUNIOR ³ ; Thiago Habner de Sousa PEREIRA ² ; Frederico Ozanam Barros MONTEIRO ² ; Janaina Serra Azul Monteiro EVANGELISTA ³ ; Ana Kelen Felipe LIMA ¹	148
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÚTEROS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE JABORANDI (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth)	153
Luciana Rocha FAUSTINO ^{1*} ; Gustavo Oliveira Monteiro ALVES ¹ ; Dandara Maria Silva ARAÚJO ¹ ; Maria de Jesus Pereira GOMES ¹ ; Jessica Maria de Jesus Ferreira da SILVA ¹ ; Leiz Maria Costa VERAS ¹ ; Cleidson Manoel Gomes da SILVA ²	153
ASSOCIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC) E BETA HIDROXIBUTIRATO COM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE VACAS LEITEIRAS GIROLANDO SUBMETIDAS A PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)	158
Luyd Otávio Amaral de CARVALHO ^{1*} ; Lana Caroline da Costa CARDOSO ² ; Marcos Vinícius de OLIVEIRA ² ; Mayra Rhayannah Lima de SOUZA ² ; Moisés Moreira LIMA ² ; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO ² ; Sebastião Tavares Rolim FILHO ² .	158
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE SOBRE AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE CRIADAS NA BAHIA	164
Hélen Larissa da Cruz OLIVEIRA ^{1*} ; Taiane Nogueira dos SANTOS ² ; Caio Victor Damasceno CARVALHO ³ ; Thereza Cristina Calmon de BITTENCOURT ⁴	164
AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE SOBRE AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM MACHOS DA RAÇA NELORE CRIADOS NA BAHIA	170
Taiane Nogueira dos SANTOS ^{1*} ; Hélen Larissa da Cruz OLIVEIRA ² ; Caio Victor Damasceno CARVALHO ³ ; Thereza Cristina Calmon de BITTENCOURT ⁴	170
AVALIAÇÃO DA VITRIFICAÇÃO DIRETA EM CRIOTUBOS NA FORMAÇÃO DE CRIOBANCO DE TECIDO SOMÁTICO DE JAGUATIRICA	176



João Vitor da Silva VIANA¹; Leonardo Vitorino Costa de AQUINO¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Matheus Barbosa do NASCIMENTO¹; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Fabiano Rocha Prazeres JÚNIOR²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 176

AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE MANEJO NUTRICIONAIS E REPRODUTIVOS EM BOVINOS COMO CRITÉRIO DE ASSOCIAÇÃO AO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS 181

Yndyra Nayan Teixeira carvalho CASTELO BRANCO^{1*}; Samira Santos ARAÚJO¹; Raquel Mesquita LIMA¹; Alana Samira da Silva SOUSA¹; Leonardo Bernardes Taverny de OLIVEIRA¹; Marlon de Araújo CASTELO BRANCO²; Deyse Nayra Mascarenhas COSTA³; Isolda Márcia Rocha do NASCIMENTO³ 181

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS EM FUNÇÃO DA SEGUNDA COLOSTRAGEM DE BEZERROS DA RAÇA GIROLANDO 187

Hugo Andrey Santos dos SANTOS^{1*}; Allana Lais Alves LIMA¹; Dayane Bentes dos SANTOS¹; Deyvid de Menezes MELO¹; Luciara Celi Chaves DAHER¹; Waldjânio de Oliveira MELO²; Bruno Moura MONTEIRO¹; Rinaldo Batista VIANA¹ 187

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES INTRACELULARES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE ONÇAS-PARDAS 192

Luanna Lorena Vieira RODRIGUES^{1*}; Yasmin Beatriz França MOURA¹, João Vitor da Silva VIANA¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA¹; Herlon Victor Rodrigues SILVA²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 192

AVALIAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE VITRIFICAÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO 198

Ariella de Oliveira AZEVEDO^{1*}; Rodrigo de Souza AMARAL¹ 198

AVALIAÇÃO DE SOLUÇÃO CRIOPROTETORA NA CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE JAGUATIRICA 204

Luanna Lorena Vieira RODRIGUES^{1*}; Karinne Yáscara Pereira AMORIM¹; Yasmin Beatriz França MOURA¹, João Vitor da Silva VIANA¹; Antonia Beatriz Mendonça PEREIRA¹; Samara Lima OLINDO¹; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 204

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS 210

Leonardo Vitorino Costa de AQUINO^{1*}; Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹; Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA¹; Tássio Lessa do NASCIMENTO²; Luciana Medeiros BERTINI²; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 210

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS REGIÕES DA PELE DE *Dasyprocta leporina* VISANDO A FORMAÇÃO DE BANCOS DE CÉLULAS SOMÁTICAS 215

João Vitor da Silva VIANA^{1*}; Leonardo Vitorino Costa de AQUINO¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Yasmin Beatriz França MOURA¹; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Moacir Franco de OLIVEIRA²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 215

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE ARIRANHA (*PTERONURA BRASILIENSIS*) 221



- Hevellen Vitória dos Santos GOMES^{1*}; Vera Maria Ferreira DA SILVA²; Rodrigo de Souza AMARAL¹ 221
- COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO CONGELADO EM TES-TRIS COM GEMA DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E DE PATA (*Anas platyrhynchos*)** 225
- André de Medeiros Costa LINS^{1*}; Adriana Novaes dos REIS²; Lilian Kátia Ximenes SILVA²; Aluizio Otávio Almeida da SILVA²; Lauro Nogueira Barbosa NETO³; Juliana Gonçalves LIMA⁴; Janayna Barroso dos SANTOS⁵ 225
- COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (*Citrus sinensis* e *Syzygium aromaticum*) SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS** 231
- Leonardo Vitorino Costa de AQUINO^{1*}; Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹; Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA¹; Tássio Lessa do NASCIMENTO²; Luciana Medeiros BERTINI²; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Alessandra Fernandes PEREIRA¹ 231
- COMPARAÇÃO ENTRE OS DILUENTES À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ E TRIS ADICIONADOS DE ÓLEO DE PEQUI NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN DE OVINOS** 237
- Eduarda de Oliveira Machado RIBEIRO^{1*}; Davi Felipe Soares COELHO¹; Thiago Vitor Gomes de SALES¹; Thamyras Myrela da Silva NASCIMENTO¹; Emilly Gabriele Correia Bezerra BRITO¹; Oscar Oliveira BRASIL²; Angélica Maria Luna COSTA¹; Gabriela Liberalino LIMA¹ 237
- COMPARAÇÃO ENTRE OS DILUENTES TRIS-GEMA E INRA-96[®] NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO** 243
- Tayná Moura MATOS^{*1}; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Ana Gloria PEREIRA¹; Luana Grasielle Pereira BEZEIRRA¹; Romário Parente dos SANTOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹ 243
- CONSERVAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE CATETOS (*Pecari tajacu*) SUBMETIDOS A REFRIGERAÇÃO EM DILUENTES COMERCIAIS** 249
- Romário Parente dos SANTOS^{1*}; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Yasmin Carla da Silva CAVALCANTE¹; Ana Gloria PEREIRA¹; Tayná Moura MATOS¹; Náyra Rachel Nascimento LUZ¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹ 249
- DEGENERAÇÃO FOLICULAR OVARIANA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO DECANOATO DE NANDROLONA** 254
- Ana Ruth Reinaldo MENEZES¹; João Eudes Farias CAVALCANTE FILHO²; Solano Dantas MARTINS³; Maria Alice Felipe OLIVEIRA³; Israel Levi Nascimento SILVA⁴; Alessandro Silva FERREIRA⁵; Valdevane Rocha ARAÚJO⁶ 254
- DIAGNÓSTICO GESTACIONAL PRECOCE EM BÚFALAS POR MEIO DA ULTRASSONOGRAFIA MODO DOPPLER** 260
- Cauê Pires Teixeira ROCHA¹; Tullio Loureiro Góes PINTO¹; Paula Di Kassya Lima MENDES¹; Glaucy Rafaela NASCIMENTO¹; João Victor Ferreira Wanzeler¹; Bruno Moura MONTEIRO³; Rinaldo Batista VIANA³; Rodrigo dos Santos ALBUQUERQUE⁴ 260



**EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA E TEOFILINA NA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE ZIGOTOS OVINOS** 267

Jossimara de Melo SILVA^{1*}; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Beatriz Cavalcanti de FREITAS¹; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹ 267

**EFEITO DA ADIÇÃO DE SELENITO DE SÓDIO AO DILUENTE TRIS-GEMA
SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA E ACROSSOMAL DE
SÊMEN OVINO CONGELADO-DESCONGELADO** 273

Beatriz Cavalcanti de FREITAS^{1*}; Paulo Ricardo Vieira da SILVA¹; Lucas Dias Rodrigues MARQUES¹; Illa Carla Santos CARVALHO²; Elenice Andrade MORAES²; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹. 273

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE TATU-PEBA
UTILIZANDO CRIOPROTETORES INTRACELULARES E
EXTRACELULARES** 279

João Vitor da Silva VIANA^{1*}; Denilza Pires FERNANDES¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹; Carlos Iberê Alves FREITAS²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 279

**EFEITO DA EXPRESSÃO DO ESTRO SOBRE OS PARÂMETROS
MORFOLÓGICOS FOLICULARES EM FÊMEAS BOVINAS INSEMINADAS EM
TEMPO FIXO** 285

Raquel Gomes do AMARAL¹; Maria Antônia Moreira MACIEL¹; Artur Azevedo MENEZES²; Marcus Vinícius Galvão LOIOLA²; Rodrigo Freitas BITTENCOURT²; Antonio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹ 285

**EFEITO DA INIBIÇÃO POR CONTATO SOBRE A SINCRONIZAÇÃO EM G₀/G₁
DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE ONÇAS-PARDAS** 290

Luanna Lorena Vieira RODRIGUES^{1*}; Yasmin Beatriz França MOURA¹; João Vitor da Silva VIANA¹; Lhara Ricarlany Medeiros de OLIVEIRA¹; Herlon Victor Rodrigues SILVA²; José de Brito VIEIRA NETO³; Claudia PESSOA³; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹ 290

**EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA SOBRE OS PARÂMETROS
FOLICULARES DE FÊMEAS ACÍCLICAS E LACTANTES SUBMETIDAS A UM
PROGRAMA DE IATF** 295

Maria Antônia Moreira MACIEL^{1*}; Raquel Gomes do AMARAL¹; Wendel Denian Silva dos SANTOS¹; Daniel Bispo FERREIRA¹; Horácio Matheus Gomes ALENCAR²; Alexandra Soares RODRIGUES¹. 295

**EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NOS ESPERMATOZOIDES
BOVINOS CRIOPRESERVADOS PELA RECUPERAÇÃO EPIDIDIMÁRIA POR
FLUXO RETRÓGRADO** 301

Sérgio Henrique COSTA JÚNIOR^{1*}; Leonardo Lopes FURTADO³; Gabriel Aquino ROCHA⁴; Muriel Alves CARVALHO²; Wallisson Bruno de Morais PACHECO²; Maria Luíza Lima CORDEIRO²; José Adalmir Torres de SOUZA⁵ 301



EFEITO DO ÁCIDO α -LIPOICO E DA L-ARGININA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS 307

Beatriz Cavalcanti de FREITAS^{1*}; Jossimara de Melo SILVA¹; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹. 307

EFEITO DO ÁCIDO TRANS-FERÚLICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ZIGOTOS OVINOS 313

Beatriz Cavalcanti de FREITAS^{1*}; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Jossimara de Melo SILVA¹; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹. 313

EFEITO DO ALL TRANS RETINAL NA MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS 319

Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA^{1*}; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Jossimara de Melo SILVA¹; Beatriz Cavalcanti de FREITAS¹; Paulo Ricardo Vieira da SILVA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹. 319

EFEITO DO ALL TRANS RETINAL SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS 325

Kealy Pimentel de OLIVEIRA^{1*}; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Paulo Ricardo Vieira da SILVA¹; Kíscyla Oliveira de ANDRADE²; Alane Pains Oliveira do MONTE²; Maria Helena Tavares de MATOS²; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹. 325

EFEITO DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* Wittm) SOBRE PARÂMETROS DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE OVINOS 331

Davi Felipe Soares COELHO^{1*}; Eduarda de Oliveira Machado RIBEIRO¹; Thiago Vitor Gomes de SALES¹; Thamyrys Myrela da Silva NASCIMENTO¹; Emilly Gabriele Correia Bezerra BRITO¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA²; Alexandre Rodrigues SILVA²; Gabriela Liberalino LIMA¹. 331

EFEITOS DO USO DE ANTIOXIDANTES NA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PÓS-DESCONGELAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE *Prochilodus brevis* 337

Kamila Teixeira DE PAULA^{1*}; Thais Maia TORRES²; Carla Tatiana Nascimento SOUSA²; Jessica Sales LOBATO²; Yasmim Maia FERREIRA²; João Eudes Farias Cavalcante FILHO²; Ana Vitória Correia SALES¹; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY². 337

EFEITO DOS DILUENTES SOBRE OS ASPECTOS CINÉTICOS DO SÊMEN REFRIGERADO DE CATETOS (*Pecari tajacu*) ARMAZENADOS A 17 °C 342

Gabriel Santos Costa BEZERRA^{1*}; Romário Parente dos SANTOS¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Yasmin Carla da Silva CAVALCANTE¹; Ana Gloria PEREIRA¹; Tayná Moura MATOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹. 342



ESTIMATIVA DA FASE DO CICLO ESTRAL POR CITOLOGIA VAGINAL EM ÉGUAS (*Equus Caballus*), ATENDIDAS NO HVU/CPCE EM BOM JESUS-PI 348

Vilian de Souza MATOS^{1*}; João Victor Souza SILVA²; Gabriela Assis da Silva BARBOSA¹; Maria Thamires Pereira de ARAÚJO¹; Rafael Alves Ferreira ARAÚJO¹; Landara Lidia Santana de CARVALHO¹; Antônio Francisco da Silva LISBOA NETO³; Manoel Lopes da SILVA FILHO⁴ 348

FERTILIDADE DE FÊMEAS BOVINAS QUE EXPRESSARAM OU NÃO O ESTRO EM UM PROGRAMA DE SINCRONIZAÇÃO PARA IATF 353

Maria Antônia Moreira MACIEL^{1*}; Raquel Gomes do AMARAL¹; Artur Azevedo MENEZES²; Marcus Vinícius Galvão LOIOLA²; Rodrigo Freitas BITTENCOURT²; Antonio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹. 353

FERTILIDADE DE FÊMEAS NELORE SUBMETIDAS À PRÉ-EXPOSIÇÃO COM PROGESTERONA EM UM PROTOCOLO PARA IATF 359

Wendel Denian Silva dos SANTOS¹; Raquel Gomes do AMARAL¹; Maria Antônia Moreira MACIEL¹; Artur Azevedo MENEZES²; Daniel Bispo FERREIRA¹; Horácio Matheus Gomes ALENCAR³; Antônio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹ 359

HISTOLOGIA UTERINA DE FETO BOVINO EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS 365

Camilla Giovanna Peixoto VIEIRA^{1*}; Larissa Cristina Silva TEIXEIRA¹; Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO¹; Bruno Porpino HOMOBONO²; Nathalia Nogueira da Costa de ALMEIDA²; Simone do Socorro Damasceno SANTOS²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO¹; Sebastião Tavares Rolim FILHO¹ 365

IMPACTO DA EXPRESSÃO DO ESTRO SOBRE CARACTERÍSTICAS MORFOFUNCIONAIS LUTEAIS DE FÊMEAS NELORE SINCRONIZADAS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO 371

Artur Azevedo Menezes²; Raquel Gomes do Amaral¹; Maria Antônia Moreira Marcial¹; Wendel Denian Silva dos Santos¹; Marcus Vinícius Galvão Loiola²; Rodrigo Freitas Bittencourt²; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho²; Alexandra Soares Rodrigues¹ 371

INFLUÊNCIA DA PRÉ-SINCRONIZAÇÃO COM PROGESTERONA INJETÁVEL SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE VACAS LACTANTES E ACÍCLICAS SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE IATF 377

Raquel Gomes do AMARAL¹; Maria Antônia Moreira MACIEL¹; Wendel Denian Silva SANTOS¹; Artur Azevedo MENEZES²; Daniel Bispo FERREIRA¹; Horácio Matheus Gomes ALENCAR³; Antonio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹ 377

INFLUÊNCIA DA SEGUNDA COLOSTRAGEM NAS MEDIDAS BIOMÉTRICAS E PESO DE BEZERROS DA RAÇA GIROLANDO 383

Hugo Andrey Santos dos SANTOS¹; Camille Gabriela Ramos PORTAL¹; Maria Eduarda Soares da SILVA¹; Samille Alexandre RODRIGUES¹; Luciana Celi Chaves DAHER¹; Waldjânio de Oliveira MELO²; Bruno Moura MONTEIRO¹; Rinaldo Batista VIANA¹ 383



- INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA FORMA DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE CATETOS (*Pecari tajacu*)** 388
Romário Parente dos SANTOS^{1*}; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Yasmin Carla da Silva CAVALCANTE¹; Ana Gloria PEREIRA; Tainá Moura MATOS¹; Yuri Gonçalves MATOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹ 388
- ISOLAMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO SOMÁTICO DE PREÁS (*Galea spixii* WAGLER, 1831)** 393
Leonardo Vitorino Costa de AQUINO^{1*}; Samara Lima OLINDO¹; Yasmin Beatriz França MOURA¹; Yara Letícia Frutuoso e SILVA¹; Ana Lívia Rocha RODRIGUES¹; Vinicius Dantas da SILVA¹; Moacir Franco de OLIVEIRA²; Alessandra Fernandes PEREIRA¹ 393
- OCORRÊNCIA DE DIARREIAS EM BEZERROS DA RAÇA GIROLANDO CRIADOS NO TRÓPICO ÚMIDO AMAZÔNICO** 398
Kevin Luigi Azevedo de VASCONCELOS¹; Allana Lais Alves LIMA¹; Gisella Lucia Alves RAMOS¹; Helena Carneiro RIBEIRO¹; Luciara Celi Chaves DAHER¹; Waldjânio de Oliveira MELO²; Bruno Moura MONTEIRO¹; Rinaldo Batista VIANA¹ 398
- PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE BÚFALOS DO NASCIMENTO AOS 18 MESES DE IDADE NA REGIÃO DA AMAZÔNIA ORIENTAL** 403
Renata Gonzaga COSTA¹; Anderson Silva COELHO²; Bruno Moura MONTEIRO²; José Dantas Ribeiro FILHO³; Raysa Brenda Marques MAIA⁴; Damazio Campos de SOUZA¹; João Lucas da Graça Andrade COSTA¹; Rinaldo Batista VIANA¹ 403
- PREJUÍZOS NO BALANÇO REDOX DO TECIDO OVARIANO DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) PROVOCADOS PELO DECANOATO DE NANDROLONA** 409
João Eudes Farias CAVALCANTE FILHO¹; Ana Ruth Reinaldo MENEZES²; Alesandro Silva FERREIRA³; Solano Dantas MARTINS⁴; Yara Silvino SALES¹; Vânia Marilande CECCATTO⁶; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY⁶; Valdevane Rocha ARAÚJO⁵ 409
- TAMANHO DE NINHADA DE CADELAS ARTIFICIALMENTE INSEMINADAS COM BASE NA CITOLOGIA VAGINAL E DIFERENTES NIVEIS DE PROGESTERONA SÉRICA** 415
Eduardo de Oliveira COSTA^{1*}; Rodrigo F. BITTENCOURT¹; Isabella de Matos Brandão CARNEIRO¹; Gleice Mendes XAVIER¹; Rodrigo Ribeiro Machado MENDES¹; Thamys COSTA¹; Mateus Martins Rodrigues dos SANTOS¹; Elisiane Sateles dos SANTOS¹ 415
- TAXA DE CONCEPÇÃO DE CADELAS ARTIFICIALMENTE INSEMINADAS COM BASE NA CITOLOGIA VAGINAL E DIFERENTES NIVEIS DE PROGESTERONA SÉRICA** 421
Rodrigo Ribeiro Machado MENDES^{1*}; Eduardo de Oliveira COSTA¹; Rodrigo F. BITTENCOURT¹; Isabella de Matos Brandão CARNEIRO¹; Gleice Mendes XAVIER; Amanda Íris dos santos CORREIA¹; Roberta Ferreira BORGES¹; Elisiane Sateles dos SANTOS¹ 421
- TAXAS DE FERTILIZAÇÃO EM MURINOS UTILIZANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO** 427



Ana Ruth Reinaldo MENEZES¹; Israel Levi Nascimento SILVA²; Solano Dantas MARTINS³; João Eudes Farias Cavalcante-FILHO⁴; Maria Alice Felipe OLIVEIRA³; Alessandro Silva FERREIRA⁵; Vânia Marilande CECATTO⁶; Valdevane Rocha ARAÚJO⁶
427

USO DE DOPPLERFLUXOMETRIA NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM FÊMEAS BUBALINAS (*BUBALUS BUBALIS*) NA ILHA DO MARAJÓ
432

Carolina Vitoria Rodrigues CARLOS^{1*}; Beatriz Rosa SILVA²; Vitoria Fonseca RODRIGUES²; Deivia Rodrigues DA SILVA²; Iago da Conceição RODRIGUES³; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO⁴; Sebastião Tavares ROLIM FILHO⁵
432

USO DO MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO POR IMERSÃO EM AGULHAS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES PRÉ PÚBERES
438

Ana Glória PEREIRA^{1*}; Andréia Maria da SILVA¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Náyra Rachel Nascimento LUZ¹; Tayná Moura MATOS¹; Thales Pinheiro Cavalcanti BEZERRA²; Alexandre Rodrigues SILVA¹
438

VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO RESFRIADO E CRIOPRESERVADO EM TES-TRIS COM GEMA DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E DE PATA (*Anas platyrhynchos*)
443

André de Medeiros Costa LINS^{1*}; Adriana Novaes dos REIS²; Lílian Kátia Ximenes SILVA²; Aluizio Otávio Almeida da SILVA²; Lauro Nogueira BARBOSA NETO³; Juliana Gonçalves LIMA⁴; Janayna Barroso dos SANTOS⁴
443

VITRIFICAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES (*Canis lupus familiaris*) PRÉ-PÚBERES UTILIZANDO CRIOTUBOS E SUPERFÍCIE SÓLIDA
449

Ana Glória PEREIRA^{1*}; Andréia Maria da SILVA¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Náyra Rachel Nascimento LUZ¹; Tayná Moura MATOS¹; Thales Pinheiro Cavalcanti BEZERRA²; Alexandre Rodrigues SILVA¹
449



APRESENTAÇÃO DO EVENTO

As Regiões Norte e Nordeste têm nas atividades agropecuárias um importante pilar para o seu desenvolvimento econômico. A capacitação tecnológica e a formação continuada dos profissionais que trabalham com as diversas áreas da medicina veterinária, em especial a reprodução animal, vivenciam o grande desafio de atender ao setor agropecuário dentro da perspectiva do desenvolvimento sustentável da Região. Dessa forma, em resposta a demanda dos pesquisadores da área de Reprodução Animal da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT) e da Universidade Federal do Sul do Pará (UNIFESSPA), e sob a anuência do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, os docentes destas instituições assumiram a missão de realizar o XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL.

Historicamente, o CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CONERA) tem tido grande participação da comunidade acadêmico-científica das áreas da medicina veterinária, zootecnia, agronomia, biologia, biotecnologia e engenharia de pesca. Esta edição do evento abordou a reprodução animal e sustentabilidade nos sistemas de criação. O evento se propôs também a realizar um fórum de discussão acadêmico e técnico sobre os diversos avanços biotecnológicos nessa área, voltado em especial aos interesses e aptidões das regiões norte e nordeste no Brasil.

O XI CONERA contou em sua grade de programação com conferências, simpósios e mesas redondas, sessões de apresentação de resumos em formato de pôsteres e apresentações orais. O evento aconteceu no período de 16 a 18 de novembro de 2022, em plataforma virtual. Assim, em nome da comissão organizadora do XI Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal, agradecemos a todos os profissionais, pesquisadores, professores e estudantes que participaram deste grande evento.

Agradece!

A Comissão Organizadora do XI CONERA!



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

**ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

RELATO DE CASO



ABSCESO PREPUICIAL EM BOVINO – RELATO DE CASO

PREPUICIAL ABSCESS IN CATTLE – CASE REPORT

Beatriz Vanderlei RIBEIRO^{1*}; Vitor Hugo Alves RIBEIRO¹; Carlos Daniel Pereira dos SANTOS¹; Andréia da Silva PEREIRA¹; Henrique dos Anjos BOMJARDIM¹; Cleidson Manoel Gomes da SILVA⁶.

¹Instituto de Estudos do Trópico Úmido, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Xinguara, PA, Brasil.

* beatriz.ribeirovet@gmail.com

Abstract

The preputial abscess can be formed from injury or anatomical modification, providing a good environment the growth of microbial. The objective of this study was to report the case of a generalized abscess in the foreskin region of an F1 Angus x Nelore bovine, raised in confinement. Clinically, an increase in volume was observed in the preputial region, with the presence of an abscess. For diagnostic purposes, a puncture of the preputial region was performed after skin cleaning and antiseptis. The lesion was rich in necrotic fibrinolytic tissue, with presence of a cloudy and reddish-yellow liquid, containing bloody secretion. After the complete drainage, the entire affected region was washed with the antiseptic 10% iodine and silver sulfadiazine was applied as repellent. The treatment was performed with systemic antibiotic application, administering 10mg/kg of oxytetracycline intravenously (IV) with an interval of 48 hours, concluding ten applications; non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), administering 0.5mg/kg of meloxicam 2% (Maxicam ®, Ourofino Animal Health), IV/SID for four days. In conclusion, the presence of preputial abscess diagnosed in the present study was successfully treated through puncture drainage associated with systemic therapy, providing a good recovery of the animal.

Keywords: foreskin, inflammation, zebu, bull.

Introdução

O sucesso da atividade pecuária depende de aspectos ligados à sanidade, genética e nutrição. Nesse contexto, o cuidado com a sanidade garante que o animal portador de elevado mérito genético e que disponha de nutrição adequada expresse seu potencial produtivo e reprodutivo satisfatoriamente (BROOM; CORKE, 2002). Logo, a saúde animal pode determinar o sucesso dos demais pilares da produção animal. Portanto, é importante que sejam adotadas medidas preventivas, evitando tratamentos onerosos, especialmente em animais destinados à reprodução (YUNG *et al.*, 1985).

As enfermidades que acometem o sistema reprodutor dos bovinos são de extrema importância para o desempenho reprodutivo. Várias são as doenças que acometem machos e fêmeas bovinas, com diversas etiologias. De modo geral, as patologias reprodutivas podem ter



origem congênita, infecciosa ou traumática (SCHURINK *et al.*, 2016; REICHEL *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2015). Entretanto, as causas traumáticas estão relacionadas a boa parte das disfunções reprodutivas em machos (RABELO *et al.*, 2012).

As patologias do sistema reprodutor masculino interferem significativamente na eficiência reprodutiva, e pode resultar em impotência, uma vez que a condição patológica pode levar a incapacidade de produzir sêmen, a incapacidade de ereção e incapacidade de realizar cópula. Dessa forma, há impacto negativo quando reprodutores portadores de alterações no trato reprodutivo são utilizados na estação de monta (ARMSTRONG, 2021; RABELO *et al.*, 2012).

Dentre as afecções mais recorrentes do trato reprodutor masculino estão as patologias prepuciais (abscesso prepucial, prolapso prepucial, divertículo prepucial, persistência do frênilo prepucial e acropostite-fimose) seguida das afecções penianas (fraturas e hematomas penianos, parafimose, desvios e fibropapilomatose) (CALCIOLARI *et al.*, 2016). Tais alterações, podem ter sua fisiopatologia de origem adquirida ou hereditária, e mesmo que não interfira sobre as características seminais afeta a habilidade do macho reprodutor em realizar a deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea. Portanto, todos os machos que serão destinados à reprodução devem passar por exame andrológico, evitando assim a inserção de machos portadores de doenças que podem ser perpetuadas no rebanho (BICUDO *et al.*, 2007)

No Brasil, em bovinos machos de origem zebuína há uma elevada prevalência (72%) de casos de traumas no sistema reprodutor, devido esses animais apresentarem prepúcio pendular e serem criados principalmente (80%) em sistemas de produção extensiva (RABELO *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2022; MENDONÇA *et al.*, 2012; KOURY FILHO, 2003; SVERSUTTI; YADA, 2019). Acredita-se que a ocorrência de traumas na região prepucial seja o principal fator predisponente para a entrada de microrganismos, que por vezes são contidos em abscessos (RABELO *et al.*, 2012).

Portanto, o objetivo deste estudo foi relatar o caso de um abscesso generalizado localizado na região caudal do prepúcio de um bovino F1 Angus x Nelore, criado em confinamento no município de Rio Maria - Pará.

Descrição do caso

Foi atendido um bovino macho, F1 Angus x Nelore, com aproximadamente 24 meses de idade, apresentando um aumento de volume na região prepucial. Este animal era criado em confinamento no Município de Rio Maria – PA.

No exame físico foi observado um aumento de volume na região prepucial, ascendendo para a região inguinal. Além disso, observou-se na extremidade prepucial a presença de lesão com área de tecido fibrinolítico necrótico (Figura 1). Para fins de diagnóstico foi realizada a punção da região inguinal, respeitando todo o protocolo de tricotomia e antissepsia da área, além da aplicação de cloridrato de lidocaína 2% para anestesia local. Com a realização da punção foi drenada uma secreção de aspecto turvo com coloração amarelo- avermelhada.

Figura 1 – Região do prepúcio de um bovino F1 Angus x Nelore, criado em confinamento.



Figura 1. Região do prepúcio de um bovino F1 Angus x Nelore, criado em confinamento. **A)** Antissepsia realizada para drenagem de abscesso prepucial. **B)** Lesão prepucial com presença de tecido fibrinolítico necrótico.

Após a drenagem cirúrgica completa, realizou-se lavagem de toda a região atingida, com a solução antisséptica iodo a 10%, sulfadiazina de prata (Bactrovet[®] spray König) e ducha de água fria por 10 minutos. Além disso, foi realizada a administração de antibiótico sistêmico, 10mg/kg de oxitetraciclina (Terramicina[®] L.A, zoets, Guarulhos, Brasil) por via intravenosa (IV) com intervalo de 48 horas, concluindo dez aplicações; foi realizada ainda a administração de



antiinflamatório não esteroidal, 0,5mg/kg de meloxicam 2% (Maxicam ®, Ourofino saúde animal), IV/SID por quatro dias.

Discussão

As enfermidades que acometem o sistema dos bovinos são de extrema importância para o desempenho reprodutivo desses animais. O abscesso prepucial, que geralmente ocorre a partir de uma porta de entrada, seja por lesão ou modificação anatômica, pois a partir das lesões os microrganismos encontram ótimas condições para a formação dos abscessos (RABELO *et al.*, 2012).

Esta patologia possui uma vasta ligação com fatores anatômicos e morfológicos da espécie, principalmente em animais zebuínos tendo em vista que o prepúcio possui uma anatomia pendular que facilita os traumas (FREITAS *et al.*, 2022). Além disso, as transformações que ocorrem no folheto prepucial quando os touros atingem a meia idade favorece o crescimento microbiano (RABELO *et al.*, 2012).

A enfermidade pode ter como diagnóstico diferencial a urolitíase e hematoma peniano (fratura peniana) (RIET-CORREA *et al.*, 2008; RABELO *et al.*, 2015; VENANCIO *et al.*, 2022). Contudo, pouco se conhece sobre a etiopatogenia desta afecção, os relatos descritos na literatura são escassos e não são totalmente esclarecedores, fazendo-se necessário a implementação de mais estudos.

Conclusão

O abscesso prepucial diagnosticado em bovino, descrito no presente relato, foi tratado com sucesso através de drenagem por punção associada à terapia sistêmica, proporcionando uma boa recuperação do animal.

Referências

- ARMSTRONG C. Management of preputial injuries in bulls. **AABP PROCEEDINGS**, v. 54, n. 2, p. 213 - 214, 2021.
- BARBOSA RT. A importância do exame andrológico em bovinos. Embrapa, Circular técnica 41, 2005.
- BICUDO SD., SIQUEIRA JB., MEIRA C. Patologias do sistema reprodutor de touros. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 43-48, jul./dez., 2007.



BROOM DM., & CORKE JM. Effects of Disease on Farm Animal Welfare. **Acta Vet.** 71:133–136, 2002.

CALCIOLARI K., BARROCO V., GRAVENA K., CANOLLA PA. Principais doenças prepúciais e penianas em bovinos - Revisão de literatura. *Rev. Investigação - Med. Vet.* 15(4):83-90, 2016.

FREITAS VM., RABELO RE., ASSIS BM., BAÓ SN., GARCIA NETO AF., OLIVEIRA LP., JESUS LO., HELFENSTEIN KK., VULCANI VAS. Morphological and morphometric characterization of the preputial ostium, internal preputial leaflet, and free part of the penises of Aberdeen Angus and Nelore bulls. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 74, n.1, p. 1-10, 2022.

KOURY FILHO W., JUBILEU JS., ELER JP., FERRAZ JBS., PEREIRA E., CARDOSO EP. Parâmetros genéticos para escore de umbigo e características de produção em bovinos da raça Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, ed. 5, pág. 594-598, 2003.

MENDONÇA AC., CARDOSO JR., MOREIRA PC., JUNQUEIRA DD., MENDONÇA FPX., BRITO E SILVA MS., SILVA DB., BRITO LAB. Caracterização morfométrica do pênis e prepúcio de touros das raças nelore e Gir. **Biosci. J**, v. 28, n. 6, p. 985-992, 2012.

RABELO RE., SILVA LAF., VIU MAO., ROMANI AF., ALVES CB., FERNANDES JJR., CASTRO CFP. Acroburstite bovina: Revisão de literatura. **Revista CFMV – Suplemento Técnico**, Brasília, Ano XII-Nº 37, p. 29- 36, 2006.

RABELO RE., VULCANI VAS., CARDOSO LD., DUTRA HT., HELRIGEL PA., VINCENTIN FR. Aspectos anatômicos e sua relação com as enfermidades do prepúcio e pênis no touro. **Rev. Cien. Elet. Med. Vet.** n. 18, 2012.

RABELO RE., SILVA LAF., VULCANI VAS., SANT'ANA FJF., BRUNO MORAES ASSIS BM., RABBERS AS. Enfermidades diagnosticadas na genitália externa de touros: estudo retrospectivo (2007 – 2013). *Cienc. anim. bras.* vol.16, núm.1, pág. 133-143, jan./mar. 2015.

REICHEL MP., WAHL LC., HILL FI., Review of Diagnostic Procedures and Approaches to Infectious Causes of Reproductive Failures of Cattle in Australia and New Zealand. **Frontiers in Vet. Science**, v. 5, Art. 222, 2018.

SILVA LF., ARAÚJO EAB., OLIVEIRA SN., DALANEZI FM., ZAHN FS., PAPA FO. Retorno à atividade reprodutiva de touro angus após fimose traumática com obliteração parcial da luz prepúcial: relato de caso. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 11, n.. 21, 2015.

SCHURINK A., JONG A., NOOIJ HR., HELLINGA I., DUCRO BJ. Genetic parameters of cryptorchidism and testis size in Friesian colts. **Livestock Science**, v. 190, pág. 136-140, 2016.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

SVERSUTTI PE., & YADA MM. Criação extensiva de bovinos de corte. V SIMTEC Simpósio de Tecnologia - Faculdade de Tecnologia de Taquaritinga. 2018. P. 382-391, 2019.

RIET-CORREA F., SIMÕES SVD., VASCONCELOS JS. Urolitíase em caprinos e ovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 28(6):319-322, 2008.

VENANCIO FR., ALBERTI TS., ZAMBONI R., SCHEID HV., RIBEIRO LS., ELIZA SIMONE VIÉGAS SALLIS ESV., SCHILD AL. Penile Fractures in Young Bulls Raised in feedlots in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2022.

YOUNG CW., EIDMAN VR., RENEAU JK. Animal Health and Management and Their Impact on Economic Efficiency. **Journal of Dairy Science**, Vol. 68, Ed. 6, Pág. 1593-1602, 1985.



ADENOCARCINOMA UTERINO ASSOCIADO À HIPERPLASIA ENDOMETRIAL CÍSTICA E LEIOMIOMA VAGINAL EM CADELA – RELATO DE CASO

UTERINE ADENOCARCINOMA ASSOCIATED WITH CYSTIC ENDOMETRIAL HYPERPLASIA AND VAGINAL LEIOMYOMA IN A FEMALE DOG: CASE REPORT

Mateus Martins Rodrigues dos SANTOS^{1*}; Isabella De Matos Brandão CARNEIRO²; Rodrigo Freitas BITTENCOURT³; Gleice Mendes XAVIER; Eduardo Oliveira COSTA; Roberta Ferreira BORGES; Amanda Íris dos Santos CORREIA; Thamys COSTA

¹Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador-BA, Brasil.

*E-mail: mateusmrs@ufba.br

Abstract

Uterine adenocarcinoma is a rare epithelial malignancy in dogs. The incidence of this neoplasm may be associated with senility, hormonal therapies and characteristics of the estrous cycle. Leiomyoma is the most common benign neoplasm in the female reproductive system, originating in smooth muscle. This paper reports a case of a 12-year-old female dog with uterine adenocarcinoma associated with cystic endometrial hyperplasia and vaginal leiomyoma, seen at the Veterinary Medicine Hospital of the Federal University of Bahia. The patient was admitted to the hospital with a major complaint of enlargement in the perianal region, underwent excision of the vaginal leiomyoma and uterine adenocarcinoma was presented as a finding during ovarian-hysterectomy. The postoperative period was performed with antibiotics, anti-inflammatory drugs and analgesics, with no need for chemotherapy protocols. There was a good postoperative evolution and the animal did not show any visible signs of recurrence after 4 months of surgery.

Keywords: Neoplasms, senility, reproductive system, hormones.

Introdução

Neoplasias reprodutivas têm baixa incidência em fêmeas da espécie canina e quando ocorrem normalmente estão associadas a senilidade e/ou características do ciclo estral (JOHNSTON *et al.*, 2001; NARDI *et al.*, 2002). Os tumores vulvares e vaginais são os mais comuns do trato genital das cadelas, quando não incluimos as neoplasias de glândulas mamárias, podendo ter origem epitelial ou mesenquimal (JOHNSTON *et al.*, 2001). Dentre elas, o leiomioma vaginal, neoplasia de origem mesenquimal, é a mais frequente. Esse tipo neoplásico provém da musculatura lisa, é benigno, não metastático, em geral não invasivo e de crescimento lento (KULA *et al.*, 2022). É de fácil diagnóstico e seu tratamento envolve a retirada cirúrgica associada a ovário-histerectomia (OH) (MENEGASSI *et al.*, 2016).

Os tumores uterinos, considerados raros, representam apenas 0,4% de todos os tumores caninos, e entre 1 a 19% de todos os tumores do trato genital feminino (JOHNSTON *et al.*, 2001).



O adenocarcinoma uterino é uma neoplasia de epitélio glandular maligna que se comporta de forma invasiva, provocando grandes alterações na arquitetura uterina, mas que normalmente apresenta moderado índice metastático. É uma neoplasia que costuma ser assintomática, sendo muitas vezes diagnósticas como achado clínico após laparotomia exploratórias, OH e exames de imagem de rotina. A conduta terapêutica e prognóstico dependem do grau de invasividade e presença de doença metastática (KLEIN, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2015).

O presente trabalho tem como objetivo relatar um caso de adenocarcinoma uterino associado a hiperplasia endometrial cística e leiomioma vaginal em uma cadela senil, atendida pelo Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Descrição do caso

Foi atendido no Hospital Veterinário Professor Renato Rodenburg de Medeiros Neto-HOSPMEV da Universidade Federal da Bahia (UFBA), um animal da espécie canina, fêmea, raça poodle, pesando 9,1kg e com 10 anos de idade. Apresentava como queixa principal protrusão de massa pelo orifício vaginal. Tutora negou histórico de cruzamentos, gestações e uso de hormônios reprodutivos. O exame específico do sistema reprodutivo, evidenciou massa protruída em região vulvar, de 0,3cm, sem obstrução uretral e ausência de secreções. Foram solicitados hemograma completo, perfil bioquímico (alanina aminotransferase, creatinina, ureia, fosfatase alcalina, proteínas totais e frações), radiografia de tórax, ultrassonografia de abdômen total, eletrocardiograma.

Não foram encontradas alterações no hemograma e o perfil bioquímico revelou aumento apenas nos valores da fosfatase alcalina. A ultrassonografia da região abdominal permitiu visibilizar alterações compatíveis com hiperplasia acentuada do endométrio com múltiplos cistos. O exame radiográfico sem alterações compatíveis com metástase. Dessa forma, foi recomendado a tutora realização de procedimento cirúrgico, para exérese da massa da região vulvar e ovário-histerectomia.

Após protocolo anestésico, paciente foi posicionada em decúbito esternal para remoção da massa vaginal, sem necessidade de realizar episiotomia. Seguidamente animal foi reposicionado, ficando em decúbito dorsal, para realização da OH. Na exploração cavitária foi observado uma massa irregular, firme e sem aderências em região de cornos uterinos. As neoformações resseccionadas foram condicionadas em formalina a 10% e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Veterinária do HOSPMEV-UFBA.



Para realização do exame histopatológico, foram encaminhados para laboratório dois fragmentos distintos. O fragmento 1 era proveniente da massa perivulvar medindo 2,5 x 1,6 x 1,2 cm, com projeção exofítica, levemente irregular, pardacento e macio; ao corte, compacto, regular, pardacento e com pontos amarronzados. Fragmento 2, cornos uterinos medindo 20,0 cm, irregular, multinodular com áreas firmes e outras macias, brancopardacento; ao corte, área de cavitação central com conteúdo branco-avermelhado (Figura 1.B). Em região inicial do corno uterino, haviam múltiplas cavitações com líquido seroso, translúcido e amarelado.

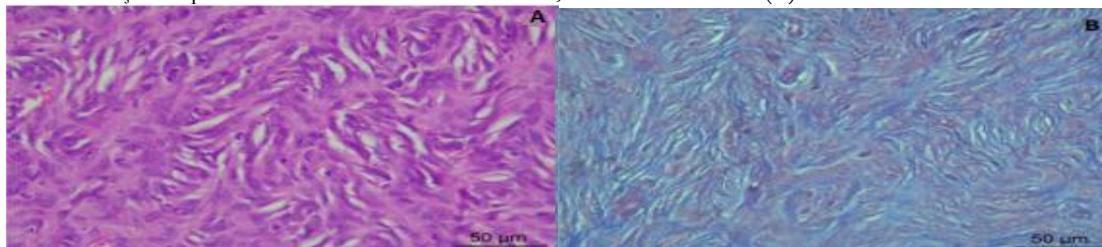
Na microscopia, o fragmento 1, foi identificado uma proliferação neoplásica de células musculares lisas, bem diferenciadas, arranjadas em feixes multidirecionais com citoplasma moderadamente eosinofílico e bordos indistintos, com núcleos alongados, finamente granulosos e moderadamente cromáticos e nucléolos por vezes evidentes. Figuras de mitose infrequentes (Figura 2.A). Sob coloração especial pelo Tricrômico de Masson, havia forte predominância de fibras musculares lisas, compatível com leiomioma vaginal (Figura 2.B)

O fragmento 2 foi compatível com adenocarcinoma uterino, caracterizado por apresentar proliferação de células epiteliais de provável origem glandular, moderadamente pleomórficas, dispostas em arranjo tubular/sólido, revelando citoplasma escasso a moderado, com bordos indistintos e eosinofílicos.

Figura 1 - Cornos uterinos brancopardacento (A); ao corte, área de cavitação central com conteúdo branco (B).



Figura 2 - Fibras musculares lisas neoplásicas, em feixes multidirecionados, com citoplasma moderadamente eosinofílico e bordos indistintos, no aumento 40x (A) e Fibras musculares lisas neoplásicas em coloração especial de Tricrômico de Masson, no aumento 40x (B).



Discussão

O animal do caso apresentava a presença de uma massa que protruía pela rima vulvar recorrentemente. Segundo Klein (2001) e Menegassi *et al.*, (2016) o leiomioma pode se apresentar como saliência do períneo ou prolapso de tecido pela vulva, podendo tornar-se inflamado, infectado, ou necrótico, com presença de corrimento vaginal. No entanto, o leiomioma apresentado possuía superfície lisa, livre de lesões ou secreções, podendo estar relacionada ao pequeno tamanho da massa, que por vezes se apresentava protegido pelo canal vaginal.

O leiomioma é considerado uma neoplasia hormônio-dependente, podendo estar associado a alterações ovarianas, terapias ou neoplasias secretoras de estrógenos, neoplasias mamárias e hiperplasia endometrial cística, de maior ocorrência em cadelas inteiras (KLEIN, 2001; MENEGASSI *et al.*, 2016). Tais informações são compatíveis com o quadro clínico apresentado, uma vez que a paciente era inteira e apresentava hiperplasia endometrial cística, sofrendo exposição hormonal a cada ciclo estral. Entretanto, pouco se sabe sobre esta afecção e sua possível relação com o desenvolvimento de adenocarcinomas uterinos (CAÇÃO, 2021).

As neoplasias uterinas são infrequentes na rotina da clínica de cadelas, e quando presentes costumam estar associadas a senilidade ou desequilíbrio reprodutivo hormonal (CAVE, 2002). Além disso, o presente relato também reporta a presença de adenocarcinoma associado a duas patologias de cunho estrogênico, hiperplasia endometrial cística e leiomioma, em cadela senil. Acredita-se que a cadela sofreu alterações acumulativas em seu sistema reprodutor, devido sucessivos ciclos estrais, onde a ação hormonal a cada ciclo predisps a modificações na arquitetura desses órgãos e instalação dessas patologias.

Conclusão



O aumento da expectativa de vida das fêmeas da espécie canina está intimamente relacionado com aumento na incidência de patologias reprodutivas, em especial o maior acometimento por neoplasias. Dessa forma, conhecer sobre as características do adenocarcinoma uterino, neoplasia de escassos relatos, e sua associação com outras patologias permite melhor entendimento acerca dos fatores de risco, formas de diagnóstico, protocolos terapêuticos e prognósticos.

Referências

ARAÚJO, E. A. B.; SILVA, L. F. M. C.; OLIVEIRA, S. N.; DALANEZI, F. M.; COSTA, L. D.; RODRIGUES, J. C.; PRESTES, N. C. Fibroma uterino em cadela. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 22, n. 2, 2016.

CAÇÃO, D. **Classificação das Hiperplasias Endometriais em coelhas (*Oryctolagus cuniculus*) seguindo a classificação de Dow**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP. São Paulo, p. 13, 2021.

CAVE, T.A.; HINE, R.; HOWIE, F.; THOMPSON, H.; ARGYLE, D.J. Uterine carcinoma in a 10 month old golden retriever. **Journal of Small Animal Practice**, v.43, n.3, p.133-135, 2002.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUSA, R.S. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Arch. Vet. Sci.**, v.7, p.15-26, 2002.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **A história do sistema TNM**. [2014]. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm>>. Acesso em: 20 jan. 2020.

JOHNSTON, S.D.; ROOT KUSTRITZ, M.V.; OLSON, P.N. **Canine and Teriogenologia Felina**. Saunders, Filadélfia. 2001

KLEIN, M.K. Tumors of the female reproductive system, *In*: WIHTROW, S.J.; MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 3.ed. Philadelphia: Saunders. p.445-454.2001.p.445-454.2001.

KULA, H.; GÜNAY, Z.; UÇMAK, I.; KIRŞAN, G.; ÖZTÜRK, Y.; GÜLÇUBUK, A.; **Clinicopathological evaluation of vaginal leiomyoma and ovarian luteoma in a bitch**. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*. Year 2022, Volume 7, Issue 2, 269 - 273, 31.08.2022

MENEGASSI CC, MARTINS ICS, PEREIRA GM, GOMES LG, BEZERRA KS, SPILLER PR, MARTINI AC, SOUZA RL, RIBEIRO AP. Aspectos clínicos, cirúrgicos, histológicos e pós-operatórios de oito cadelas com leiomioma vaginal. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.68, n.2, p.307-312, 2016.



ADENOMA MAMÁRIO DE FELINO MACHO - RELATO DE CASO

MAMMARY ADENOMA IN MALE FELINE - CASE REPORT

Karina Emily Vieira dos SANTOS^{1*}; Larissa Cristina Uchôa da COSTA¹; Andreza Soares CARDOSO¹; Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO¹; Saulo Autran Moura PALHA¹; Sebastião Tavares ROLIM FILHO²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO²

¹Residentes da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

²Docentes da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

*E-mail: karinaemilyvs@gmail.com

Abstract

This work reports the case of follow-up and diagnosis of mammary duct adenoma in a male cat, mixed breed, 2 years old, attended in the metropolitan region of Belém, with the main complaint of the presence of rapidly evolving abdominal nodules. The hypothesis was that as soon as the animal was rescued, the owner believes that an hormonal contraceptive medication was administered in a wrong way, since the animal was mistaken for a queen. After clinical evaluation, a cytology exam was requested for diagnostic confirmation. As it is an uncommon case among male animals, the case becomes relevant for studies on conditions that can affect the reproductive tract of male cats.

Keywords: mammary gland, tumor, contraceptive medication, animal reproduction.

Introdução

Os tumores benignos de mama em felinos constituem apenas 15% a 30% de todas as neoplasias da glândula mamária (TRAVASSOS, 2006). O Adenoma de ducto mamário trata-se do aumento tecidual das glândulas mamárias de forma rápida e reversível, caracterizada, principalmente, por seu comportamento benigno. Os tumores benignos podem ser classificados como adenomas simples, complexo e basalóide, fibroadenomas de baixa e alta celularidade, tumor misto benigno e papiloma ductal (SPADER, 2009).

De acordo com Gimenez (2010) o fibroadenoma é a neoplasia mamária benigna mais comumente descrita na espécie felina podendo envolver uma ou todas as glândulas, já o adenoma ductal e tumor misto benigno podem ser considerados raros. A maioria dos tumores benignos acomete animais jovens, do sexo feminino, que têm ciclo, mas também pode ser encontrado em gatas prenhes (GIMENEZ, 2010).

Este tipo de proliferação tecidual é incomum em machos, uma vez que está fortemente associado ao uso de progestágenos sintéticos, utilizados como método de contracepção em fêmeas, ao estro, gestação ou pseudogestação. Ferreira (2003) afirma que a administração regular de progestágenos pode elevar em três vezes o risco de surgimento de neoplasmas mamários benignos.



Para ser realizado o diagnóstico, é necessária uma anamnese completa, incluindo a idade, condição sexual, uso de contraceptivos e duração dos sinais clínicos, além de exames complementares como a citologia para estabelecer o prognóstico e conduta terapêutica efetiva (SPADER, 2009).

O tratamento vai depender da causa subjacente, fêmeas inteiras deverão passar pelo procedimento de ovariário-histerectomia, suspender o uso de progestágenos sintéticos, administração de aglepristona, fármaco bloqueador dos receptores de progesterona, sendo algumas vezes necessária a excisão cirúrgica das neoplasias mamárias benignas (GIMENEZ, 2010). Diante deste cenário, por se tratar de uma afecção incomum em felinos do sexo masculino, será descrito o atendimento, acompanhamento clínico e diagnóstico de um felino diagnosticado com adenoma em ducto mamário.

Objetivo

O presente trabalho tem por objetivo relatar o caso de atendimento a um felino macho acometido por adenoma mamário em hospital veterinário na região metropolitana de Belém, Pará.

Descrição do Caso

No dia 29 de julho de 2022, foi atendido no Hospital Veterinário Professor Mário Dias Teixeira/Ufra em Belém, Pará, um felino, macho, sem raça definida, com aproximadamente 2 anos de idade. O animal deu entrada com queixa principal de aparecimento de nodulações próximas ao abdômen. Animal estava clinicamente estável, urinando e defecando normalmente, com normofagia e normodipsia. O animal havia sido resgatado e a tutora ainda não havia realizado controle de endo e ectoparasitas, não havia vacinado e o felino ainda tinha livre acesso à rua. Além disso, não soube informar a respeito do uso de medicação hormonal contraceptiva e as nodulações já estavam presentes quando foi adotado. Animal não castrado, pênis e testículos dentro da normalidade.

Ao exame físico, na ausculta o paciente não apresentou alterações, temperatura de 39 °C, estado geral ativo, mucosas normocoradas, turgor cutâneo menor que 2 segundos, normohidratado e linfonodos não reativos. À palpação abdominal, observou-se nodulações localizadas nas mamas abdominais direita e esquerda, com tempo de evolução indeterminado, consistência macia, parcialmente aderidos, não ulcerados.



Como exames complementares foram solicitados hemograma, bioquímica sérica, exame citológico de nódulo mamário, radiografia torácica e ultrassonografia abdominal, sendo autorizado apenas a citologia. O exame citológico foi coletado por meio de punção aspirativa por agulha fina totalizando 7 lâminas.

Microscopicamente, observou-se células epiteliais de perfil basalóides, com núcleos arredondados e centrais, cromatina densa, nucléolos proeminentes, citoplasma basofílico, observou-se também anisocitose e anisocariose discreta com pleomorfismo celular baixo, havia presença de neutrófilos íntegros e células em atividade fagocítica com características citológicas de adenoma em ducto mamário. Após o diagnóstico, foi recomendado que o animal fizesse uso de Aglepristone (Alizin®), no entanto, a tutora não retornou para prosseguimento do tratamento.

Discussão

A apresentação típica da doença inclui aumento das glândulas mamárias, que podem estar edematosas e produzindo leite, algumas vezes esse aumento é significativo a ponto de prejudicar a locomoção do animal, além de causar isquemia no tecido gerando ulceração e necrose (CONCANNON e VERSTEGEN, 2005; JELINEK *et al.*, 2007). No caso relatado pode-se observar mamas aumentadas e edematosas, porém ainda não havia presença de ulcerações ou necrose e o animal, apesar do incômodo, ainda possuía locomoção adequada.

A aparência citologia dessa afecção consiste em uma população de células uniformes epiteliais cubóides arranjadas em espessos grupos, sendo elas caracterizadas por densos núcleos redondos com nucléolos pequenos e escassa quantidade de citoplasma basofílico. Uma população mesenquimal de células fusiformes com núcleos ovais e estreitos e citoplasma afilado também estão presentes (MESHER, 1997). Nas lâminas analisadas foram observadas células epiteliais de perfil basalóide e com núcleos arredondados e centrais, semelhante ao descrito na literatura, cromatina densa, os nucléolos apresentavam-se proeminentes, citoplasma basofílico.

Travassos (2006) em seu estudo constatou que gatas que fizeram uso de medicamentos hormonais para a inibição do estro possuem risco 3 vezes maior de desenvolver tumores mamários em relação aos animais não submetidos a esse tipo de terapia e o aparecimento dessa alteração em machos está relacionada ao uso desses fármacos. Devido ao animal acima relatado não ter histórico, não é possível confirmar que o mesmo recebeu a medicação, porém de acordo com o quadro clínico do animal, é a causa mais provável.



Como conduta terapêutica eficiente nos casos de neofomações benignas de células mamária, Vasconcellos (2003) recomenda a utilização de Aglepristone (Alizin®), uma vez que o mesmo age bloqueando os receptores de progesterona, sem torná-los inativos, o que permite a recidiva da alteração. Na literatura já foi relatado o uso dessa medicação em felinos machos em casos de hiperplasia mamária, sendo parte da terapia em conjunto com a remoção da causa base, que no caso relatado não pode ser confirmada, mas já não estava mais presente. Foi recomendado o uso do Aglepristone, totalizando 4 aplicações, por via subcutânea, a cada 24 horas, no entanto, tutora não retornou para dar prosseguimento ao tratamento por questões logísticas.

Conclusão

Pode-se concluir que, de modo geral, o diagnóstico e acompanhamento do nódulo mamário observado após exame físico e exame citológico com características de adenoma em um gato macho pode evidenciar que o desenvolvimento de neoplasias mamárias está intimamente relacionado com desequilíbrios hormonais, sendo eles fisiológicos ou provocados de forma exógena nos animais domésticos, especialmente em felinos, não sendo comuns em animais do sexo masculino. Mesmo não sendo confirmada a hipótese de que o animal fez o uso de progestágenos, o surgimento do nódulo mamário está diretamente relacionado com desequilíbrios hormonais no animal.

Referências

- CONCANNON, P. W.; VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline female reproduction important in veterinary practice. **World Small Animal Veterinary Association**, v. 30, n. 2005, p. 1-8, 2005.
- FERREIRA, A. M. R.; AMORIM, F.V. **Neoplasia mamária**. In: Souza HJM, editor. Coletâneas em medicina e cirurgia felina. Rio de Janeiro: L. F. Livros de Veterinária; 2003. p.327-337.
- FILGUEIRA, K. D.; RECHE-JÚNIOR, A. **Neofomações da glândula mamária felina-parte I: neoplasias malignas e benignas**. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária-Pequenos Animais e Animais de Estimação, v. 10, n. 33, p. 244-255, 2012.
- GIMÉNEZ, F.; HECHT, S.; CRAIG, L. E.; LEGENDRE A. M. **Early detection, aggressive therapy: optimizing the management of feline mammary masses**. J Feline Med Surg 2010; 12(3): 214-224.



JELINEK, F., BARTON, R., POSEKANA, J., e HASONOVA, L. **Gynaecomastia in a tom-cat caused by cyproterone acetate: a case report.** VETERINARNI MEDICINA-PRAHA-, v. 52, n. 11, p. 521, 2007.

MESHER, C. I. **What is your diagnosis? Subcutaneous nodule from a 14-month-old cat.** Veterinary clinical pathology, v. 26, n. 1, p. 4, 1997.

SPADER, M.B. **Estudo epidemiológico, classificação histológica e fatores prognósticos pela técnica de quantificação das AgNORs em tumores mamários felinos** [Dissertação de Mestrado]. Pelotas: Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; 2009.

TRAVASSOS, F. **Lesões mamárias felinas** – contributo para a sua caracterização biopatológica [Tese de Doutorado]. Trás-os-Montes e Alto Douro: Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2006.

VASCONCELLOS, C. H. C. **Hiperplasia mamária.** In: SOUZA, H. J. M. Coletâneas em medicina e cirurgia felina. Rio de Janeiro: L. F. livros de veterinária, 2003. p. 231-237.



ARTRITE SÉPTICA SECUNDÁRIA A FERIDA TRAUMÁTICA EM POTRA MAMANDO – RELATO DE CASO

SEPTICAL ARTHRITIS SECONDARY TO TRAUMATIC WOUND IN NURSING FOAL– CASE REPORT

Isadora Luisa Menegucci SCAHETTI^{1*}; Aluisio BUENO^{2**}; Fernanda Carlini Cunha dos
SANTOS^{3***}

¹ Discente no Reproamazon, Universidade Federal do Pará, Belém- Pará, Brasil

² Médico Veterinário, Western Veterinary Hospital, in San Angelo, Texas

³ Docente Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-Roraima,
Brasil

*isah_scachetti@hotmail.com; **isobueno@gmail.com; ***carlini.fernanda@hotmail.com

Resumo

A artrite séptica é uma afecção de grande importância na clínica de equinos, podendo afetar tanto jovens como adultos. A contaminação das articulações por microrganismos devido a feridas penetrantes é comum. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi relatar um caso de artrite séptica em uma potra jovem, mamando, secundária a ferida traumática. A potra de aproximadamente 6 meses foi atendida devido a lesão perfurante na região dorsolateral da banda coronária, no membro torácico esquerdo. Foram realizados exames complementares, incluindo radiografia, tomografia, artroscopia, e a potra foi diagnosticada com artrite séptica em articulação metacarpo falangeana, secundária a lesão traumática. O animal foi tratado com antibioticoterapia local e sistêmica, apresentando melhora no quadro clínico, porém com prognóstico reservado quanto a vida atlética futura. O atendimento e tratamento adequado de jovens acometidos com artrite pode permitir seu uso futuro, especialmente para fins reprodutivos, quando o animal apresenta alta genética.

Palavras-chave: podologia, trauma, ferida.

Abstract

Septic arthritis is a condition of great importance in the equine clinic, which can affect both young horse and adults. Contamination of joints by microorganisms due to penetrating wounds is common. In this context, the objective of this study was to report a case of septic arthritis in a young suckling foal, secondary to a traumatic wound. The foal aged approximately 6 months was treated due to a perforating lesion in the dorsolateral region of the coronary band, in the left anterior limb. Complementary tests were performed, including radiography, tomography, arthroscopy, and the foal was diagnosed with septic arthritis in the metacarpophalangeal joint, secondary to traumatic injury. The animal was treated with local and systemic antibiotic therapy, showing improvement in the clinical picture, but with a reserved prognosis regarding future athletic life. Adequate care and treatment of young horses affected with arthritis may allow its future use, especially for reproductive purposes, when the animal has high genetics.

Keywords: podiatry, trauma, wound.



Introdução

Em animais jovens, a artrite séptica pode envolver a membrana sinovial, osso periarticular ou ambos, acometendo principalmente potros com menos de 60 dias de idade.

As articulações podem ser contaminadas com bactérias ou fungos, secundariamente a feridas com comunicação articular, por disseminação hematogênica, por extensão de infecção periarticular ou por inoculação iatrogênica (SOUTO *et al.*, 2013). Quando há contaminação bacteriana de uma articulação, desencadeia-se uma resposta inflamatória severa, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, radicais livres e enzimas por parte de sinoviócitos, condrócitos e neutrófilos, que induzem um círculo vicioso de inflamação e lesão de tecidos intra-articulares (GERVÁSIO, 2007).

Qualquer articulação pode estar envolvida, mas geralmente as articulações maiores, como a fêmurotibiopatelar, tibiotalársicas, o carpo e as articulações metacarpofalangeanas e/ou metatarsofalangeanas, são afetados com mais frequência (TRUMBLE, 2018).

Em neonatos, o risco de infecção articular é maior durante os primeiros 30 dias de vida, devido a parcial ou completa falha na transferência passiva de imunoglobulinas (THOMASSIAN, 2005). Dependendo da gravidade da lesão, região envolvida, evolução frente a tratamento, a artrite séptica pode resultar em lesões permanentes, afetando a qualidade de vida futura do animal.

Objetivo

O deste trabalho foi relatar um caso de artrite séptica em uma potra jovem, mamando, secundária a ferida traumática.

Descrição do caso

Foi atendida uma potra, da raça Quarto de Milha, mamando, com 6 meses de idade, apresentando uma ferida em membro torácico. Esta fêmea era criada solta a pasto, com sua respectiva mãe, sendo que o proprietário relatou que observou a lesão há aproximadamente uma semana, sem saber como aconteceu. O proprietário administrou com flunixin meglumine e não observou melhora, sendo assim optou por encaminhar para atendimento.

No exame físico foi observado comportamento apático, temperatura retal: 39,1°C (valor de referência 37°C a 39,5°C) frequência cardíaca: 60 bpm (valor de referência 40 a 80 bpm) frequência respiratória: 20 rpm (valor de referência 20 a 40 rpm) (Valores de referência: MENDONÇA, 2014).



A potra apresentou uma lesão perfurante na região dorsolateral da banda coronária, no membro torácico esquerdo.

Foi realizado exame complementar com o aparelho Lameness locator, a partir do mesmo observou-se que a potra apresentou claudicação grau 5/5, ou seja, grau máximo. Foram realizados exames radiográficos no membro torácico esquerdo, na região metacarpiana, nas posições latero lateral e dorso palmar, onde foi observado edema de tecido mole da banda coronária e um fragmento ósseo. Uma sonda metálica foi inserida na lesão, para observar a profundidade, sendo a mesma inserida até próximo a articulação da falange distal.

A potra foi diagnosticada com artrite séptica em articulação metacarpo falangeana, secundária a lesão traumática. Como tratamento inicial, foi administrado sulfato de amicacina 5mg/kg na veia cefálica, com garrote realizado na região carpiana, permanecendo por 15 minutos. Foi realizado debridamento e lavagem da lesão, seguida de colocação de bandagem.

Foi realizado tomografia, com potra submetida a anestesia geral. Durante a tomografia foi possível observar uma lesão óssea e de cartilagem subcondral grave, entre segunda e terceira falange (articulação da falange distal), osteomielite e fratura em segunda falange. Imediatamente após a tomografia, foi realizada artroscopia. Na artroscopia foi possível observar a falange distal e o osso subcondral do membro torácico esquerdo com contaminação séptica, sendo assim foi realizado debridamento e lavagem, infusão de antibiótico local amicacina 5mg/kg na veia cefálica associado a administração de gentamicina 6.6mg/kg IV uma vez por dia por 7 dias e colocação de bandagem.

O proprietário foi informado da gravidade da situação e sobre prognóstico reservado quanto a vida atlética futura. Diante dessa situação, o proprietário optou por manter a fêmea a campo até que atingisse a puberdade e considerando sua genética, seria usada futuramente para fins reprodutivos.

Discussão

A artrite séptica é uma enfermidade que acomete os potros e também os equinos adultos, sem predisposição quanto à idade, sexo ou raça, sendo uma das principais doenças progressivas e erosivas das articulações (BOTEJO *et al.*, 2012) e que pode afetar a vida futura atlética.

A contaminação bacteriana das articulações pode ocorrer por três vias principais: hematogena, contaminação local por feridas penetrantes e iatrogênicas (PILLE *et al.*, 2009). No presente caso a contaminação ocorreu devido ao trauma direto causado por uma lesão perfurante



na região dorsolateral da banda coronária no membro torácico esquerdo, embora não tenha sido possível identificar como esta lesão ocorreu, uma vez que a potra estava a campo.

Além do histórico e exame físico, o raio-X, a ultrassonografia e exames mais complexos como cintilografia, tomografia e ressonância magnética podem ser utilizados para auxiliar na avaliação do quadro (MORTON, 2005). Levando em consideração que o edema e dor em várias articulações podem vir acompanhados de doença generalizada e/ou anormalidade da função de outros sistemas orgânicos, no presente caso foi necessário a realização de exames complementares específicos como radiográficos, tomográficos e artroscopia. O resultado destes exames permitiu a obtenção do diagnóstico definitivo.

O tratamento tem como objetivo principal eliminar o microrganismo causador da doença sendo que a terapia antimicrobiana sistêmica de amplo espectro é recomendada independentemente da causa da artrite séptica (MORTON, 2005). No presente relato foram utilizados antibióticos de amplo espectro, administrados tanto por infusão local como por via parenteral.

Taxas de sobrevivência dos potros afetados pela artrite séptica vêm aumentando ao longo dos anos, variando de 42% a 84,1% (STASHAK, 2006). Essa tendência pode ser decorrente do aumento da conscientização da condição entre proprietários e criadores, bem como disponibilidade de diagnóstico e protocolos eficazes de tratamento. No presente caso, a potra apresentou sobrevivência, apresentando melhora no quadro clínico a medida que o tratamento estava sendo executado.

Conclusão

Em potros jovens, a artrite séptica é uma alteração grave, que representa um risco de vida imediato, devido as possíveis complicações (como envolvimento de múltiplos órgãos e septicemia), assim como pode prejudicar a vida atlética futura. O atendimento e tratamento adequado de jovens acometidos com artrite pode permitir seu uso futuro, especialmente para fins reprodutivos, quando o animal apresenta alta genética.

Referências

BOTEJO, C. S. et al. **Artrite séptica equina em neonato decorrente de onfaloflebite diagnosticada na cidade de Manaus-AM.** In: XXVI Jornada Científica do Curso de Medicina Veterinária, 2012, Manaus. Anais eletrônicos, Manaus: Escola Superior Batista do Amazonas,



2012. Disponível em: <http://jjvet.wordpress.com/2012/04/26/artrite-septica-equina-em-neonato-decorrente-de-onfaloflebitediagnosticada-na-cidade-de-manaus-am/>.

GERVÁSIO, R. A. C. S. **Clínica de Equinos**. Orientador: Professora Doutora Elisa Varela Bettencourt. 2007. 102 p. Relatório de estágio (Mestrado integrado em medicina veterinária) - Universidade de Évora Escola de Ciências e Tecnologia, 2007.

MENDONÇA, M. **Determinação dos parâmetros fisiológicos e utilização da câmera termográfica para diagnosticar lesões em equinos de salto na cidade de João Pessoa-PB**. 2014. Monografia (Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar), UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE, Curso de Medicina Veterinária, Campus de Patos ± PB, 2014.

MORTON, A. J. **Diagnosis and Treatment of Septic Arthritis**. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, v. 21, n. 3, p. 627-649, 2005.

PILLE, F. et al. **A retrospective study on 195 horses with contaminated and infected synovial cavities**. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, v. 78, p. 97-104, 2009.

SOUTO, P. C. et al. **Poliartrite Séptica em Potros**. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013 – UFRPE. 2013. 3 f. Relato de caso (Experimental) - Recife, 2013.

STASHAK, T. S. **Claudicação em Eqüinos Segundo Adams**: 5.ed. Editora Roca: 2006.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. 4ª ed. Editora Varela, São Paulo, 2005. 260p.

TRUMBLE, T.N. **Joint and Skeletal Disorders**. In: BERNARD, W.V., BARR, B.S. Equine Pediatric Medicine 2 ed. CRS Press, 2018.



CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM PREPÚCIO DE EQUINO IDOSO – RELATO DE CASO

SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN THE PREPUCE OF AN ELDERLY EQUINE – CASE REPORT

Fernanda Carlini Cunha dos SANTOS^{1*}; Eduardo Rebelato SAKIS²; Géssica Luiza Scariot²;
Maurício Adan NAEHER³; Carlos BONDAN⁴; Leonardo Porto ALVES^{2**}

¹Docente no Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-Roraima, Brasil

²Docente no Instituto de Desenvolvimento do Alto Uruguai (IDEAU), Getúlio Vargas/RS e Passo Fundo/RS, Rio Grande do Sul, Brasil

³Médico Veterinário Autônomo

⁴Docente na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

*carlini.fernanda@hotmail.com

**alveslp75@gmail.com

Resumo

O carcinoma de células escamosas é uma neoplasia cutânea importante em equinos. No presente trabalho, relatamos o caso de um carcinoma de células escamosas em prepúcio de um equino. Um equino macho, castrado, sem raça definida, com cerca de 20 anos de idade, foi apreendido por maus tratos, apresentando uma massa em genitália externa. Após avaliação clínica e resultados de exame histopatológico foi obtido diagnóstico definitivo de carcinoma de células escamosas e realizada como tratamento exérese. Em virtude da gravidade da lesão associado ao quadro sistêmico do paciente, o prognóstico foi considerado reservado. O paciente apresentou dificuldades na cicatrização e piora no quadro clínico geral, sendo assim, por questões humanitárias, a eutanásia foi recomendada. Concluímos que a idade avançada e estado de saúde geral foram fatores que dificultaram a melhora clínica, mesmo com diagnóstico e tratamento instituídos de forma adequada.

Palavras-chave: histopatologia, neoplasia, pênis, prepúcio.

Abstract

Squamous cell carcinoma is an important cutaneous neoplasm in horses. In the present work, we report the case of a squamous cell carcinoma in the prepuce of a horse. A 20-year-old male, orchietomized, mixed-breed, was apprehended for mistreatment, presenting a mass on the external genitalia. After clinical evaluation and histopathological examination, a definitive diagnosis of squamous cell carcinoma was obtained and excision was performed as treatment. Due to the severity of the injury associated with the patient's systemic condition, the prognosis was considered poor. The patient presented difficulties in healing process and worsening in the general clinical condition, therefore, for humanitarian reasons, euthanasia was recommended. We concluded that advanced age and general health status were factors that hindered clinical improvement, even with an adequate diagnosis and treatment.

Keywords: histopathology, neoplasm, penis, prepuce.



Introdução

O carcinoma de células escamosas (CCE), também chamado de carcinoma epidermoide ou carcinoma espinocelular, é uma das neoplasias cutâneas mais comuns em equinos (Silva et al., 2015). Esta é uma neoplasia com caráter maligno, invasivo e proveniente dos queratinócitos (TILLMANN *et al.*, 2017). Normalmente o crescimento do CCE é lento e apresenta baixa frequência de metástase (TÚLIO *et al.*, 2009).

Os locais de maior ocorrência são em áreas com rarefação pilosa e falta de pigmentação da pele, como pálpebras, pênis ou vulva. O aparecimento de contaminação bacteriana secundária e presença de conteúdo purulento são comuns devido à localização da massa, em região cutânea superficial.

O prognóstico varia de favorável, para aqueles animais com pequenas lesões diagnosticadas precocemente, a reservado, para pacientes com neoformações infiltrativas extensas ou com formação de metástase (SALEME *et al.*, 2015).

Objetivo

No presente trabalho, relatamos o caso de um carcinoma de células escamosas em prepúcio de um equino macho idoso.

Descrição de caso

Um equino macho, castrado, sem raça definida, pelagem castanha, com aproximadamente 20 anos de idade foi atendido devido a queixa de lesão em região inguinal. O animal era proveniente de resgate por denúncia de maus tratos, sendo assim não foi possível obter um histórico detalhado.

Ao exame físico foi verificado escore corporal 1 (escala 0-5), frequência cardíaca de 34 bpm, frequência respiratória de 14 mpm, temperatura retal 37,6°C, tempo de perfusão capilar de 2 segundos, normotilidade intestinal e mucosas pálidas.

Na região de prepúcio foi verificada uma massa, com aspecto granulomatoso, ulcerado, com secreção serosanguinolenta. Lateralmente ao prepúcio havia dois orifícios com presença de miíase e acúmulo de secreção purulenta, semelhante a um abscesso.

O exame hematológico revelou hematócrito 26% (anemia); plaquetas 236 μ /L e leucócitos $9000 \times 10^3/\mu$ l. O animal apresentou resultado negativo para anemia infecciosa equina e mormo.



A massa na região de prepúcio apresentava aspecto sugestivo de neoplasia, sendo assim, foi realizado biópsia e o resultado histopatológico confirmou o diagnóstico de carcinoma de células escamosas.

Foi realizado tratamento com lavagem com água corrente, remoção de larvas de miíase e aplicação de spray repelente à base de sulfadiazina de prata. Além disso, devido ao estado corporal ruim e saúde debilitada do paciente foi administrado antiparasitário oral a base de ivermectina e suplementação com minerais e vitaminas por via oral, por 30 dias consecutivos, para que o animal tivesse condições sistêmicas mínimas para encaminhamento para o procedimento cirúrgico. Por 14 dias consecutivos, sendo 7 antes e 7 após a cirurgia, foi administrado flunixin meglumine 1,1mg/kg IV SID, gentamicina 6,6mg/kg IM SID e penicilina 20.000UI/kg IM SID.

Após esse período, o equino foi submetido a anestesia geral intravenosa, posicionado em decúbito dorsal, para remoção cirúrgica da neoplasia. Foi possível remover a massa em sua totalidade, com ampla margem de segurança de pele. Os dois orifícios laterais ao prepúcio eram grandes, profundos e continham conteúdo purulento encapsulado, sendo realizado curetagem da lesão e intensa limpeza.

Após a remoção, a massa foi encaminhada para exame histopatológico. Macroscopicamente apresentou formato indefinido, superfície irregular e ulcerada, consistência firme; aos cortes, eram pobremente delimitadas, de aspecto sólido a multilobular e coloração branco-pardacenta com áreas acastanhadas. Microscopicamente havia proliferação de queratinócitos atípicos, densamente celular, mal delimitada e invasiva, que se estende da epiderme além dos bordos de clivagem; organizada em ninhos de células bem agrupadas e, por vezes, em padrão sólido, demonstrando formação de depósitos de queratina, eventualmente com formação de pérolas; os componentes celulares apresentam limites bem distintos, citoplasma fortemente eosinofílico, núcleo arredondado, anisocariose acentuada, e cromatina grosseiramente pontilhada contendo de um a três grandes nucléolos hipercromáticos; o pleomorfismo e a anisocitose são marcantes, e o índice mitótico é de 27 figuras de mitose em 10 CGA, sendo várias destas bizarras. Ao exame histopatológico foi novamente confirmado o diagnóstico de carcinoma de células escamosas.

No pós-operatório foi realizada limpeza diária da ferida cirúrgica seguida de aplicação de spray repelente à base de sulfadiazina de prata, além de seguir a suplementação alimentar. Em



virtude da extensão da lesão e neoformações infiltrativas extensas associadas ao quadro sistêmico do paciente, o prognóstico foi considerado reservado.

O animal apresentou dificuldades de cicatrização local e piora no quadro clínico geral, com emagrecimento progressivo mesmo com manutenção de alimentação balanceada e suplementação. Diante disso, da idade avançada e por questões humanitárias foi recomendada a eutanásia.

Discussão

O CCE pode acometer qualquer espécie doméstica e qualquer região do corpo do animal, porém sua predisposição por equinos castrados é maior, sendo o local afetado normalmente na genitália externa (VAN DEN TOP *et al.*, 2010), similar ao relato no presente caso, associado a isso também foi constatado que era um equino idoso e que provavelmente a lesão evoluiu por meses, devido a extensão.

Raças com pelagem despigmentada como Appaloosa, Belgas, Paint Horse, Lusitanos e suas cruzas estão dentre as mais acometidas, porém cavalos de qualquer raça ou sem raça definida também podem ser afetados (RAMOS *et al.*, 2007). No presente relato, o animal não apresentava pelagem despigmentada e sim com tonalidade castanha, não sendo considerada uma das mais predispostas.

A suspeita clínica é obtida através de histórico, anamnese e exame físico, no entanto a obtenção de diagnóstico definitivo é obtida através de citologia ou histopatologia. O tratamento pode ser feito com exérese, criocirurgia, radiação ionizante, quimioterapia e terapia fotodinâmica (FERNANDES, 2007). O tratamento de eleição quando diagnosticado precocemente é o cirúrgico (FERNANDES, 2007). No presente caso, a suspeita clínica e diagnóstico definitivo foram obtidas semelhante ao descrito na literatura, sendo optado como forma de tratamento a exérese cirúrgica, devido a disponibilidade e sendo esta a opção de eleição. Mesmo com diagnóstico e terapêutica adequada, o prognóstico foi considerado reservado devido a condição clínica do paciente e idade, sendo associado a estes fatores a não adequada recuperação do equino.

Conclusão

O carcinoma é uma neoplasia cutânea importante em equinos, com caráter maligno. No presente caso, houve suspeita clínica ao realizar o exame físico, sendo obtido diagnóstico definitivo através de biópsia e avaliação histopatológica.



Como tratamento foi instituído exérese cirúrgica, com remoção total da lesão. O prognóstico foi considerado reservado, devido a extensão da lesão, tempo de evolução e estado geral do paciente.

A idade avançada, escore corporal ruim e histórico de resgate de maus tratos recente são fatores que dificultaram a melhora clínica, mesmo com diagnóstico e tratamento instituídos de forma adequada.

Referências

- RAMOS, A. T.; NORTE, D. M.; ELIAS, F.; FERNANDES, C. G. Carcinoma de células escamosas em bovinos, ovinos e eqüinos: estudo de 50 casos no sul do Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p. 5-13, 2007.
- FERNANDES, C. G. Neoplasias em ruminantes e equinos. *In*: RIET-CORREA, F. *et al.* (Eds.), **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. Santa Maria, Rio Grande do Sul: Gráfica e Editora Pallotti, p. 650-656, 2007.
- SALEME, J. C.; OLIVEIRA, S. M.; JUNQUEIRA, J. R. C.; GOIOZO, P. L. I.; SILVA, E. O. Carcinoma de células escamosas vulvar em bovino: relato de caso. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v.11, p. 54-59, 2015.
- SILVA, S. C. G.; ALVES, A. D.; RONNAU, M.; TORRES, M. B. A. Carcinoma de células escamosas em equino com metástase pulmonar: relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.9, p. 689-698, 2015.
- TILLMANN, M. T.; FELIZ, A. O. C.; FERNANDES, C. G.; CAPELLA, S. O.; MUELLER, E. N.; NOBRE, M. O. Pacientes com carcinoma de células escamosas - relação do tratamento com o prognóstico. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45, n.1, 2017.
- TÚLIO, L. M.; SHIMADA, M.; MARTINS, L.; MEIRELLES, A.; ZIMPEL, R.; RIAL, A. Paraparesia espástica e hiperreflexia em um bovino associada a carcinoma de células escamosas: relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, p.76-82, 2009.



CRIPTORQUIDISMO BILATERAL EM SUÍNO (*S. domesticus*) – RELATO DE CASO

BILATERAL CRYPTORCHIDISM IN PIG (*S. DOMESTICUS*) – CASE REPORT

Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO^{1*}; Saulo Autran Moura PALHA¹; Ayla Pereira OLIVEIRA¹; Karina Emily Vieira dos SANTOS¹; Renzo Brito LOBATO¹; Lana Caroline da Costa CARDOSO²; Sebastião Tavares Rolim FILHO³; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO³

¹Residente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

²Graduanda, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

³Docente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

*E-mail: julianavasconcelosmedvet@gmail.com

Abstract

Cryptorchidism is a disease in which one or both testes fail to descend into the scrotum, in which may be retained in the inguinal path or abdominal cavity, and may cause behavioral changes manifested through libido, decreased sperm quality and reproductive performance. This work reports the diagnosis, as well as the correction of a bilateral cryptorchidism in a 52 kg crossbred swine, which was submitted to clinical exam and abdominal ultrasound, in order to locate the retained testes. Upon clinical examination, the right testicle was accurately identified in the subcutaneous inguinal topography, while the left testicle wasn't identified by palpation, but located in the abdominal cavity and confirmed by the aid of an ultrasound device. A cryptorchidectomy surgical procedure was performed on both testicles and samples from the left one were sent for histopathological analysis. In the macroscopic examination, the material had a fibroelastic consistency and a regular surface; in the microscopic examination, the cells presented signals of degeneration and hyperplasia of its parenchyma, as a result of the retention within the abdominal cavity.

Keywords: Testicular degeneration, Cryptorchidectomy, Animal reproduction.

Introdução

Atualmente, o Brasil ocupa a quarta posição no ranking dos maiores produtores e exportadores mundiais, apresentando produção de mais de 4,7 milhões de toneladas de carne suína, sendo cerca 3,5 milhões de toneladas voltadas para consumo nacional e cerca de 1,02 milhões de toneladas voltadas para o consumo internacional, segundo a Associação Brasileira de Produção Animal (ABPA, 2022).

Com a grande procura por carne suína nos últimos anos pelo consumidor final, o setor de suinocultura vem se desenvolvendo progressivamente em todos os aspectos, desde o manejo higiênico sanitário até o manejo reprodutivo, visando o aumento na produtividade e diminuição dos custos do que rege o setor (ABPA, 2022).



No Brasil, a castração em suínos machos é uma prática obrigatória durante o manejo de corte, uma vez que o odor da carne do macho não castrado causa prejuízos econômicos ao produtor. O odor é decorrente de compostos naturais, a Androstenona (feromônio sexual masculino) e o Escatol (metabólito do triptofano), produzido pelas bactérias presentes no intestino do suíno que se acumulam na gordura subcutânea e intramuscular, causando odor na carne do macho quando não castrado ou criptorquida (ABCS, 2014).

O Criptorquidismo, por definição, é a condição em que o animal apresenta falha na descida de um ou de ambos os testículos para a bolsa escrotal, respectivamente, denominado por criptorquidismo unilateral ou bilateral (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O testículo pode ser localizado no tecido subcutâneo em região pré-escrotal, em região inguinal ou em cavidade abdominal. Além dos suínos, esta afecção é frequentemente descrita em outros animais domésticos, como em cães, cavalos e bois (SASSO, 2021). Quando o animal apresenta esta condição, a espermatogênese é interrompida devido a temperatura testicular se manter continuamente equiparada à temperatura corporal do animal, que gira em torno de 38,0 a 40,0 °C (FAN *et al.*, 2021).

Esta termorregulação ineficaz interfere diretamente na espermatogênese, acarretando no baixo desempenho metabólico e reprodutivo, o que interfere no ganho de peso da carcaça, bem como no maior risco de surgimento de neoplasias ou até mesmo a morte do indivíduo acometido (WOOD; ELDER, 2009).

Microscopicamente, encontram-se comumente os processos de degeneração e apoptose, enquanto que macroscopicamente encontram-se alterações tais como hipoplasia ou hiperplasia testicular, áreas de petéquias, fibrose e até processos neoplásicos diversos, como seminoma e sertolioma (FAN *et al.*, 2021).

Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo relatar o acompanhamento, diagnóstico e correção de criptorquidismo bilateral em um suíno, Belém, Pará, Brasil.

Descrição do Caso

No dia 30 de junho de 2022 na Universidade Federal Rural da Amazônia pelo Setor de Reprodução Animal, foi realizado o exame clínico, diagnóstico e procedimento cirúrgico de excisão testicular bilateral, criptorsectomia, em um suíno. O animal sem raça definida, pesando 52 kg, foi



diagnosticado através do exame físico de inspeção e palpação, como um animal criptorquida bilateral, com o testículo direito localizado em região inguinal na porção subcutânea adjacente à parede abdominal, enquanto o testículo esquerdo encontrava-se inserido dentro da cavidade, sendo necessário utilizar aparelho de ultrassonografia abdominal para a localização intracavitária.

O animal foi submetido a jejum hídrico e alimentar prévio de 12 horas. Foi realizado como medicação pré anestésica (MPA) Zoletil 100 (4mg/Kg), Xilazina 2% (1mg/Kg), morfina 10mg/ml (0,5 mg/Kg), todos através da via intramuscular (IM). Em seguida, através do acesso venoso na veia marginal da orelha direita, foi realizado 2 bolus durante o trans operatório de cetamina concentração 10% (1mg/Kg), sempre que o animal apresentava alteração de plano anestésico indicando que estava superficializando. Foi feita a lavagem do abdômen com água e sabão líquido, seguido de antissepsia com gluconato de clorexidina 2% e álcool 70%. Por fim, realizado na linha da incisão e intracavitária (7 mg/Kg) de lidocaína (lidojet).

Após a preparação anestésica, o animal foi posicionado em decúbito dorsal para colocação dos panos de campo operatórios, dando início à abordagem cirúrgica, a qual foi realizada por meio da técnica de laparotomia exploratória, realizando-se uma incisão no abdômen, na linha paramediana esquerda, na região topográfica visualizada por meio do ultrassom, com lâmina de bisturi nº 24. O tecido subcutâneo foi divulsionado e, com bisturi, realizou-se incisão na musculatura abdominal, até o devido acesso à cavidade.

A criptorquidectomia foi realizada por meio da secção do cordão espermático, após realização de ligadura proximal por meio de fio de sutura Poliglactina nº 0 estéril. Foi realizado o fechamento da cavidade abdominal com padrão de sutura “sultan” com fio de Nylon nº 0 estéril, redução do espaço morto com fio absorvível Poliglactina nº 1 e fechamento de pele utilizando fio de Nylon nº 1 estéril, em pontos simples isolados.

O protocolo pós operatório utilizado foi Cetoprofeno (300mg/100Kg) SID, durante 4 dias; Dipirona (2,5g/100Kg) BID, durante 5 dias; Enrofloxacina 10% (500mg/100Kg) SID, durante 5 dias, todos via intramuscular (IM). Foi prescrita a antissepsia do local cirúrgico 1x ao dia, solução para limpeza a base de gluconato de clorexidina 2% e seguida aplicação tópica de sulfadiazina de prata (Spray Prata) até a completa cicatrização da área. No retorno ao local, 15 dias após o tratamento pós-operatório, o paciente apresentava bom estado clínico e a área da ferida cirúrgica cicatrizada.



Discussão

O criptorquidismo, assim como as hérnias umbilicais e escrotais, ocupa o ranking das afecções mais relatadas em granjas na suinocultura mundial (LAGOS, 2020). O diagnóstico do criptorquidismo bilateral é realizado majoritariamente por meio de exame clínico e/ou com auxílio do exame ultrassonográfico transabdominal (SCOLLO *et al.*, 2016). No presente estudo, o testículo direito retido em região inguinal foi de fácil identificação, devido sua superficialização, podendo ser identificado através da palpação.

Quando o testículo está localizado mais profundamente na região inguinal ou dentro da cavidade abdominal, o método de palpação se torna mais difícil e menos sensível. O testículo esquerdo que se encontrava retido dentro da cavidade abdominal era o mesmo antímero que foi relatado por Skelton *et al.* (2021) como mais frequente, sendo que na palpação apresentou pouca sensibilidade o que levou a necessidade de utilizar a ultrassonografia como ferramenta diagnóstica, assim como afirma Carbonari *et al.* (2022).

Carbonari *et al.* (2022) afirma que na medicina veterinária a utilização de ultrassonografia transabdominal apresenta benefícios tais como redução da manipulação cirúrgica e do tempo pós-operatório, o que consequentemente refletirá em uma melhor recuperação do animal no pós-operatório.

Em relação à técnica cirúrgica utilizada para remoção dos testículos, optou-se pela abordagem inguinal para o testículo direito, enquanto que para o testículo esquerdo, utilizou-se a abordagem por laparotomia com incisão paramediana esquerda, semelhante às descritas nos procedimentos descrito por Scollo *et al.* (2016). Ambas as técnicas foram realizadas com menor manipulação possível, visto que a utilização de ultrassonografia possibilitou a identificação das estruturas anatômicas compatíveis com o testículo esquerdo na mesma região incisada, a linha paramediana esquerda. O testículo esquerdo estava envolvido em líquido dentro de estrutura semelhante à descrita por Scollo *et al.* (2016) em seu experimento como o gubernáculo (*gubernaculum testis*).

Ambos testículos apresentavam tamanhos similares, sendo que o testículo esquerdo apresentava área cranial com aumento de tamanho, consistência fibroelástica e petéquias ao longo de sua superfície irregular, portanto, o exame histopatológico apenas neste testículo. Na macroscopia, observou-se áreas puntiformes de 1,53 cm em sua superfície e diâmetro de 4,0 cm



em região final, 4,5 cm em medial e 6,0 cm em cranial. Ao corte, o parênquima apresentou coloração vermelho escuro e zona mediastinal esbranquiçada.

Na microscopia, o testículo apresentou estado de afuncionalidade pela ausência de células germinativas, espermatozoides, vacuolização das células de sertoli e células intersticiais proliferadas, denotando hiperplasia celular. Além disso, foi identificado presença de sangue livre intersticial com tecido de granulação em túnica albugínea, que ao relacionar com as alterações macroscópicas, como a presença de petéquias, fibrose, superfície irregular e líquido no gubernáculo, sugerem processo degenerativo, decorrente de uma possível alteração vascular obstrutiva local, como a torção do cordão espermático encontrada em outras espécies por Fuke *et al.* (2020).

Conclusão

Conclui-se que o criptorquidismo unilateral é uma afecção reprodutiva mais comum em suínos, entretanto, quando o animal é acometido de forma bilateral o relato se torna cada vez mais incomum nesta espécie, o que se torna comum como forma de tratamento, a criptorquidectomia, evitando assim, odor na carne do macho. Em situações em que o animal possui ectopia testicular intra abdominal, os métodos de diagnóstico mais comuns para detecção de criptorquidismo bilateral e abdominal é por meio da utilização de ultrassonografia.

Referências

ABCS - Associação Brasileira de Criadores de Suínos. Produção de Suínos: teoria e prática / Coordenação Editorial ABCS; Coordenação Técnica da Integral Sol. em **Produção Animal**. Brasília - DF, 2014.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual**, 2022. Disponível em <<http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf>>. Acesso em 14 de outubro de 2022.

CARBONARI, A.; LILLO, E.; CICIRELLI, V.; SCIORSCI, R. L.; RIZZO, A. The Use of Abdominal Ultrasound to Improve the Cryptorchidectomy of Pigs. **Animals**. v. 12, p. 1763. 2022.

FAN, X.; LIU, Y.; YUE, M.; YUE, W.; REN, G.; ZHANG, J.; ZHANG, X.; HE, J. Effect of Cryptorchidism on the Histomorphometry, Proliferation, Apoptosis, and Autophagy in Boar Testes. **Animals**, v. 11, n.5, 1379f. 2021.

FUKE, N.; KITAHARA, G.; ITO, S.; VAN DIEP, N.; PING TEH, A. P.; IZZATI, U. Z.; MYINT, O.; HIRAI, T.; TORISU, S.; KANEKO, Y.; SATO, H.; HIDAKA, Y.; OSAWA, T.;



YAMAGUCHI, R. Severe Degenerative Changes in Cryptorchid Testes in Japanese Black Cattle. **Veterinary Pathology**. 2020.

HAFEZ, B; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**, 7º ed. Barueri: Manole, p. 291 - 93; 313, 2004.

LAGOS, E. B. **Análise de associação genômica para hérnia umbelical em suínos comerciais utilizando abordagem de marcadores únicos e múltiplos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). 114 f. Ponta Grossa, 2020.

SASSO, T. **Cirptorquidismo em bovino: Relato de caso**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Campus Curitibanos. Medicina Veterinária. 2021.

SCOLLO, A.; MARTELLI, P.; BORRI, E.; MAZZONI, C. Pig surgery: cryptorchidectomy using an inguinal approach. **Veterinary Record**, v. 178, n. 24, p. 609–609. 2016.

SKELTON, J. A.; BAIRD, A. N.; HAWKINS, J. F.; RUPLE, A. Cryptorchidectomy with a paramedian or inguinal approach in domestic pigs: 47 cases (2000-2018). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 258, p. 1130–1134. 2021.

WOOD, H. M.; ELDER, J. S. Cryptorchidism and Testicular Cancer: Separating Fact From Fiction. **The Journal of Urology**, v. 181, n. 2, p. 452–461. 2009.



HAMARTOMA VASCULAR OVARIANO EM CADELA: RELATO DE CASO

OVARIAN VASCULAR HAMARTOMA IN A BITCH: CASE REPORT

Amanda Íris dos santos CORREIA^{1*}; Gleice Mendes XAVIER¹; Rodrigo Freitas BITTENCOURT¹; Marcus Vinicius Galvão LOIOLA¹; Lara Mariane Rios BARBOSA¹; Eduardo Oliveira COSTA¹; Isabella de Matos Brandão CARNEIRO¹; Mirella S MIRANDA¹.

¹Escola de Medicina de Veterinária, Universidade Federal da Bahia. Av. Milton Santos, 500. Campus Ondina, Salvador/BA. CEP: 40170-110.

*E-mail: aamandairis@gmail.com

Abstract

The hamartoma is a congenital alteration characterized by a disorder in the disposition and proportion of the different types of cells in the affected organ, and has limited capacity for growth, presenting histological characteristics of benignity, which indicates that is an alteration is not carcinogen. Among the classifications, vascular hamartoma stands out, which is characterized by a disorganized growth of vascular tissue in the affected area. Clinical signs depend of the damaged zone and size of the mass, but vascular hamartomas can rupture and cause hemorrhage, while large hamartomas can cause compression. That alteration has already been reported in several species and in the canine there are reports occurring in a variety of organs such as brain, nasopharynx and liver. However, there are no reports in literature on ovarian vascular hamartoma in female dogs. Therefore, the present work had to report a case of ovarian vascular hamartoma in a female 7-year-old ShihTzu.

Keywords: Angiogenic, malformation, neoplasia.

Introdução

Os ovários fazem parte do sistema reprodutor feminino tendo como funções básicas a função endócrina e a gametogênica. Dentre as alterações que podem acometer esse órgão, no que diz respeito a espécie canina, os cistos e as neoplasias são as mais comuns, causando modificações em sua morfologia, tamanho e função (SANTOS *et al.*, 2006). Porém, existem outras alterações que podem modificar a morfologia, topografia e tamanho dos ovários, dentre estas alterações encontra-se o hamartoma vascular.

Os hamartomas são alterações congênicas não neoplásicas que consistem em um crescimento excessivo de tecidos maduros e normais encontrados no órgão atingido, além disso, continuam seu desenvolvimento até o animal atingir a maturidade (SCHLAFER *et al.*, 2016). Dentre os vários tipos, destaca-se o hamartoma vascular, correspondendo a um crescimento benigno e desorganizado do tecido vascular da área acometida. Pode ser diagnosticado ao



nascimento, mas geralmente isso ocorre mais tardiamente devido ao aumento de suas dimensões causado por trauma, infecção, trombo e hemorragia (TAKAGI *et al.*, 2018).

O hamartoma vascular já foi relatado em diversas espécies e no que diz respeito à espécie canina, existem relatos dessa alteração acometendo uma variedade de órgãos, tais como: coração, cérebro, nasofaringe e fígado (GUALTIERI *et al.*, 2009; TJOSTHEIM *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2020; JUDY *et al.*, 2020). Essa alteração foi pouco descrita no sistema reprodutor de animais sendo relatado no útero de uma rata da raça Sprague-Dawley (SHIROTA *et al.*, 2013), enquanto Beccaglia *et al.* (2008) relataram um caso de hamartoma vascular vaginal numa cadela da raça pug de 3 anos de idade. No que diz respeito aos ovários existem relatos deste distúrbio nas espécies bovina, equina e suína (LEE; LADDS, 1976; RHYA; D'ANDREA, 1981; MCENTEE, 2012), entretanto, não há relatos na literatura a respeito de hamartoma vascular ovariano diagnosticado na espécie canina. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo relatar um caso de hamartoma vascular ovariano em uma cadela da raça Shih-Tzu de 7 anos de idade.

Descrição do caso

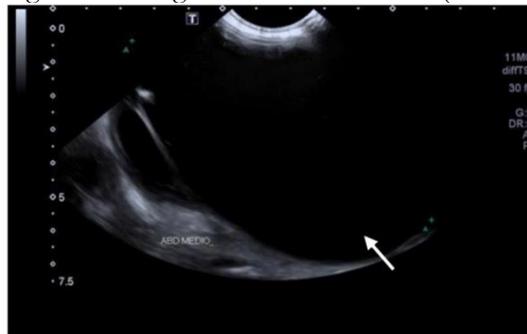
Foi atendido no Hospital de Medicina veterinária da UFBA, uma cadela da raça Shih-Tzu de 7 anos de idade, não castrada apresentando histórico de apatia, hiporexia e polidipsia num período de uma semana, bem como aumento de perímetro abdominal, tutora nega ter observado secreção vulvar durante esse período. Em relação ao histórico reprodutivo foi relatado cio regular e um episódio de pseudociese há um ano. Segundo a tutora o animal nunca copulou sendo então nulípara. Ao exame físico da paciente foi observado temperatura de 39,2°C, mucosas levemente hipocoradas e todos os demais parâmetros fisiológicos dentro da normalidade. À palpação abdominal foi possível observar aumento de volume abdominal em região meso e hipogástrica e ausência de dor à palpação.

Ao exame ultrassonográfico abdominal foi possível visibilizar ovário direito apresentando dimensões normais (0,59 cm x 1,15 cm), contornos regulares e bem definidos, parênquima com ecotextura e ecogenicidade preservadas. Ovário esquerdo e útero não foram visibilizados. Também foi visto estrutura de grandes dimensões (10,13 cm), de formato ovalado, contornos hiperecogênicos, preenchido por conteúdo anecogênico (líquido) (figura 1). A estrutura descrita ocupava grande parte da cavidade abdominal, estendendo-se desde o abdômen cranial até o caudal



e deslocando estruturas e órgãos abdominais da sua anatomotopografia habitual. Além disso, havia presença de discreta quantidade de líquido livre de aspecto hipocogênico em cavidade abdominal.

Figura 1 - Imagem ultrassonográfica de estrutura de formato ovalado, contornos hiperecogênicos e preenchida por conteúdo anecogênico em região de abdome médio (seta branca).



Frente a estes achados foi tomada a decisão de realizar laparotomia exploratória após a realização e análise de todos os exames pré-cirúrgicos, que indicaram anemia normocrômica normocítica e leucocitose por neutrofilia. Durante a cirurgia, foi visibilizado presença de pequena quantidade de líquido livre abdominal de aspecto serosanguinolento e massa de coloração avermelhada escurecida, superfície lisa e consistência flutuante oriunda de ovário esquerdo, apresentando íntimas aderências ao intestino grosso, parede abdominal, omento e ureter esquerdo. O ureter esquerdo sofreu consequente ruptura devido as íntimas aderências à massa, sendo então realizada a nefrectomia do rim direito após a ovariectomia. Foi coletada amostra da secreção de consistência serosanguinolenta contida em área cística da massa ovariana para realização da cultura e antibiograma, além disso, o aparelho reprodutor foi enviado para exame histopatológico.

Macroscopicamente foi possível observar ovário esquerdo apresentando aumentado de volume (10,4 x 7,5 x 5,6 cm), superfície irregular, coloração enegrecida e consistência flutuante, ao corte, exibia cavidade cística de 6,5 x 4,6 cm, contendo abundante quantidade de substância gelatinosa vermelho-enegrecida, superfície irregular e por vezes multilobular (figura 2). Já ovário direito, cornos e corpo uterino não exibiram alterações macroscópicas significativas.

A cultura da secreção da massa ovariana evidenciou a presença da bactéria *Staphylococcus aureus*. Os cortes histológicos revelaram em ovário esquerdo espessa cápsula de tecido conjuntivo contendo múltiplos vasos sanguíneos maduros de tamanhos variados, em geral, tortuosos e irregulares repletos de eritrócitos e, por vezes, contendo trombos (figura 2). Havia extensas áreas de necrose de coagulação e focos hemorrágicos, bem como moderado infiltrado inflamatório misto multifocal.

Figura 2 - Aparelho reprodutor da paciente. Massa presente em ovário esquerdo, de superfície lisa e coloração enegrecida, apresentando secreção serosanguinolenta (seta branca) (A). Corte evidenciando cavidade cística e conteúdo gelatinoso vermelho-enegrecido (B). Secção histológica de ovário esquerdo. Evidenciando espessa cápsula de tecido conjuntivo contendo múltiplos vasos sanguíneos maduros de tamanhos variados, tortuosos e irregulares repletos de eritrócitos e contendo trombos (seta preta) (C).



Nas consultas de avaliação pós-cirúrgica, a tutora relatou bom estado geral, animal alerta, apresentando normofagia, normoquesia, normúria e normodipsia. Aos exames físicos foi possível observar todos os parâmetros dentro da normalidade. Foram coletados novos exames hematológicos e bioquímicos, bem como urina para exame de urinálise e todos eles apresentaram resultados dentro do padrão fisiológico. A paciente recebeu alta médica e encaminhamento para acompanhamento periódico com nefrologista.

Discussão

O hamartoma vascular é uma condição rara relatada em alguns animais tais como cães, gatos, equinos e bovinos. Existem poucos relatos de hamartomas vasculares ovarianos na literatura sendo a maioria deles achados incidentais em animais de produção descritos por Lee e ladds (1976), Rhya e D'andrea (1981) e Mcentee (2021).

A paciente do presente trabalho possuía ciclo estral regular e não foram observadas alterações no ovário contralateral. Sabe-se que o hamartoma vascular ovariano não é uma condição hormonalmente ativa, como descrito por Pires e Payan-Carreira (2014) e Sasidharan *et al.* (2021), sendo assim, não causa irregularidades do ciclo estral ou alteração da morfofisiologia do ovário contralateral, diferente dos principais cistos ovarianos e de tumores de células do cordão sexual, entretanto, outras alterações císticas e neoplásicas não secretórias dos ovários também se enquadram em diagnósticos diferenciais para hamartoma ovariano.

No presente estudo foi possível observar a presença de líquido serosanguinolento livre no abdome da paciente no momento da laparotomia exploratória. Sabe-se que exsudato fibrinoso,



hemorragias e contaminação da cavidade abdominal por bactérias pode levar a formação de aderências através da migração de fibroblastos para a região em questão (ELLIS, 1962), o que pode explicar as aderências entre o ovário aumentado, órgãos e estruturas abdominais no presente relato de caso, visto que, suspeita-se de hemorragia oriunda da massa.

A bactéria *S. aureus* pertence a microbiota vaginal da cadela, e está envolvida na etiologia do complexo hiperplasia endometrial cística-piometra (DYBA *et al.*, 2021). A paciente do presente relato não demonstrou quadro de hiperplasia endometrial cística-piometra evidente, entretanto, no exame histopatológico do útero foi possível observar infiltrado inflamatório multifocal composto por neutrófilos e piócitos. Esses achados são compatíveis com quadro de hiperplasia endometrial cística grau I (acentuada) de acordo com a classificação histológica de Dow (1959), podendo sugerir que havia um foco de infecção no útero da paciente.

Conclusão

Embora esta seja uma alteração congênita incomum, o hamartoma vascular ovariano deve ser levado em consideração durante o exame clínico, ultrassonográfico e histopatológico em casos de cadelas que apresentam aumento do tamanho dos ovários. Devido a sua natureza benigna a ovariohisterectomia oferece um tratamento simples e curativo para essa alteração bem como um bom prognóstico, entretanto a hemorragia e possíveis aderências á órgãos e estruturas abdominais podem levar a complicações tanto no estado clínico geral da paciente quanto ao tratamento cirúrgico.

Referências

- ELLIS, Harold. The aetiology of post-operative abdominal adhesions an experimental study. **British Journal of Surgery**, v. 50, n. 219, p. 10-16, 1962.
- TAKAGI, Satoshi et al. Mandibular vascular hamartoma in a cat. **Journal of Veterinary Medical Science**, p. 18-0148, 2018.
- SASIDHARAN, Jisna K. et al. Ovarian cysts in the bitch: An update. **Topics in companion animal medicine**, v. 43, p. 100511, 2021.
- SANTOS, K. R. P. et al. Análise histológica do ovário de ratas submetidas à ausência de luz. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, p. 269-276. 2006.
- SCHLAFER, Donald H.; FOSTER, Robert A. Female genital system. Jubb, Kennedy & **Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 3**, p. 358, 2016.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

SHIROTA, Mariko et al. Vascular hamartoma in the uterus of a female Sprague-Dawley rat with an episode of vaginal bleeding. **Toxicologic pathology**, v. 41, n. 7, p. 1011-1015, 2013.



HEMANGIOSSARCOMA MAMÁRIO EM CADELA: RELATO DE CASO

MAMMARY HEMANGIOSARCOMA IN A FEMALE CANINE: CASE REPORT

Amanda Feitosa da CONCEIÇÃO^{1*}; Fábio samy Oliveira de SOUSA²; Juliana Vasconcelos FIGEIREDO³; Karina Emily Vieira dos SANTOS⁴; Saulo Autran Moura PALHA⁵; Renzo Brito LOBATO⁶; Haroldo Francisco RIBEIRO⁷; Sebastião Tavares Rolim FILHO⁸.

¹Graduanda, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

²Graduando, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

³Residente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

⁴Residente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

⁵Residente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

⁶Residente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

⁷Docente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

⁸Docente, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Para, Brasil.

*amandafeitosaa25@gmail.com

Abstract

Hemangiosarcoma is a malignant neoplasm of mesenchymal cell origin, which mainly affects elderly and large dogs. Thus, this report aims to highlight the clinical and cytological findings of a 10-year-old female American Cocker Spaniel dog treated at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal Rural da Amazônia. For this purpose, blood count, serum biochemistry, neoplastic content puncture for cytology, abdominal US, ECG and echocardiogram were performed. Hereupon, the animal underwent a mastectomy of the right mammary chain, promoting a good recovery.

Keywords: cytology, clinical signs, breast HSA.

Introdução

De acordo com McGavin (2013) o sufixo sarcoma significa “crescimento carnosos”, o qual refere-se a um tumor maligno onde sua origem se dá nas células embrionárias mesenquimais. Estas, formadas durante a vida fetal, darão origem a diversas estruturas, como células sanguíneas, endotélio dos vasos celulares, pleura e peritônio de vísceras, vagina, útero e tubas uterinas (HITTELL, 2012). Portanto, qualquer órgão vascularizado ou proveniente dessa linhagem de células embrionárias pode ser acometido por este tipo de neoplasia, em que os sítios de proliferação mais comuns são baço, coração direito e fígado (MEDEIROS *et al.*, 2013).

O Hemangiossarcoma (HSA) é uma neoplasia altamente agressiva, maligna, com alto poder metastático e de rápida proliferação no tecido, em que é frequentemente diagnosticada em cães com idade entre oito e treze anos, sendo importante ressaltar que sua alta capacidade metastática é resultado da rápida proliferação pela via hematogênica, ademais, o HSA pode apresentar formações



cavitárias capaz de alterar a cascata de coagulação, culminar no desencadeamento de coagulação intravascular disseminada - CID (MEDEIROS *et al.*, 2013; FREITAS, 2019; FILHO, 2022).

Apesar do HSA ser uma neoplasia de alta ocorrência em cães, o hemangiossarcoma mamário é raro (MEDEIROS *et al.*, 2013), podendo estar presente em apenas 2,2% de tumores malignos mamários (FILHO *et al.*, 2018).

Objetivo

Este relato de caso tem como objetivo elencar as alterações clínicas e aspectos citológicos culminados pela presença do HSA mamário no organismo de um canino de 10 anos, haja vista a escassez de trabalhos na literatura brasileira acerca desta doença em caráter mamário.

Descrição do Caso

No dia 19 de abril de 2022, uma fêmea, canina, a qual possuía 10 anos, raça Cocker Spaniel Americano, pesando 14,900kg foi atendida no Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira, no intuito de tratamento para um nódulo mamário de crescimento rápido, cerca de 4 meses. Conforme a anamnese, a paciente havia tido 6 filhotes antes da castração realizada 5 anos atrás, nunca teria feito uso de anticoncepcionais, vacinas múltiplas, antirrábica e vermifugação estavam em dia, alimentava-se apenas de ração, petiscos, e raramente de comida.

Ao exame físico, pôde-se constatar nodulação de consistência firme, aderida a musculatura abdominal de característica infiltrativa, inflamatória e não ulcerativa, localizada entre a mama abdominal cranial direita e mama torácica cranial direita, medindo 6 cm de comprimento e 6 cm de largura.

A priori instaurou-se o seguinte tratamento: Meloxicam 0,1mg/kg SID por 5 dias, Dipirona 25mg/kg TID por 5 dias, Omeprazol 1mg/kg SID por 5 dias em jejum e Doxiciclina 10mg/kg SID por 15 dias.

Foram solicitados exames de hemograma, bioquímica sérica, exame citológico, eletrocardiograma (ECG), ultrassonografia abdominal e raio-x de tórax. No hemograma somente o resultado de plaquetas encontrava-se alterado com resultado indicativo de trombocitopenia nas quantidades de 108.00mil/mm³, enquanto que o normal deveria estar entre 200.000 e 500.00 mil/mm. Nos resultados da bioquímica sérica a fosfatase alcalina apresentou valores elevados 156,4 U/L (valor referência: 20 a 150 U/L), proteínas totais mostraram-se alteradas 5,2 U/L (valor



referência: 5,8 a 7,9 U/L) e globulinas pouco abaixo do esperado 1,8 g/dL (valor referência 2,3 a 5,2 g/dL).

No exame citológico, foi realizada colheita do tipo PAF (punção por agulha fina) observando-se os seguintes resultados: raras células de natureza mesenquimal com formato fusiforme, apresentando núcleos ovais, cromatina condensada e nucléolos proeminentes; o citoplasma apresentou bordas indistintas e de coloração basofílica. Além disso, notou-se presença de células inflamatórias, plasmócitos, linfócitos, hemácias, agregado plaquetário e pontos azul-escuro compatíveis com pontos hemorrágicos, culminando em resultado sugestivo de hemangiossarcoma.

Além destes, o laudo de ultrassonografia abdominal (US) evidenciou hepatomegalia, esplenomegalia acompanhada de estrutura cística, com diferencial para nódulo esplênico. O eletrocardiograma (ECG) revelou resultados sugestivos de sobrecarga de ventrículo esquerdo. Posteriormente, no retorno realizado dia 29 de abril de 2022 o animal respondeu positivamente aos tratamentos para controle da dor e inflamação, podendo ao final das medicações realizar o exame de coagulograma, que mostrou resultado de 9,9 segundos, superior ao esperado (referência: 6,4 a 7,4 segundos), com o tempo de tromboplastina parcial ativado mostrando o resultado de 14,22 segundos (referência: 9 a 11 segundos).

Para melhor compreender as alterações supracitadas, solicitou-se ecocardiograma, o qual apontou disfunção diastólica grau I, e PCR para hemoparasitoses devido a trombocitopenia o qual apresentou resultados negativos.

Devido às alterações que o animal apresentou durante o acompanhamento, foi solicitada a avaliação de um profissional oncologista para avaliar a possibilidade da retirada do nódulo, uma vez que poderia ser de risco. Porém, foi sugerido a realização da mastectomia unilateral da cadeia mamária direita, a qual ocorreu no dia 25 de maio de 2022.

As medicações pós operatórias foram de uso oral: Cefalexina 15 mg/kg SID por 7 dias, Meloxicam 0,1 mg/kg SID por 4 dias, Dipirona 25 mg/kg BID por 5 dias e Cloridrato de Tramadol 2mg/kg por 4 dias. Para uso tópico, foi solicitado fazer a limpeza do local onde foi realizado a cirurgia com solução fisiológica cloreto de sódio 0,9% e gaze a cada 24 horas, além da borrifação do antisséptico timerosal bactericida. O animal retornou 15 dias depois da cirurgia para a retirada dos pontos, apresentando excelente recuperação.



Discussão

Dada a agressividade do HSA associada à idade do animal, faz-se necessária a realização dos exames complementares exploratórios e pré-operatórios. Os achados do ecocardiograma os quais apresentaram disfunção diastólica, parece estar relacionado não com o HSA, haja vista que não houve identificação de metástase no coração, mas sim com a idade do animal.

De acordo com Cruvinel (2013) a disfunção diastólica é a dificuldade do preenchimento ventricular, onde em idosos, está associada ao envelhecimento do interstício ventricular esquerdo acarretando diminuição do relaxamento e complacência do órgão, mesmo em animais saudáveis sem sinais clínicos, sendo considerado um achado normal em animais de idade avançada. Em contrapartida, a trombocitopenia que é um achado comum na HSA e que pode estar relacionado à infiltração de células malignas na medula óssea, hematopoiese extramedular, fragmentação das hemácias e hemorragia intracavitária. (DELECK, 2016; FREITAS *et al.*, 2019). Portanto, a trombocitopenia pode explicar os resultados alterados dos exames de tempo e protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativado que podem sugerir também a presença de Coagulação Intravascular Disseminada (CID) (DELECK, 2016).

Na US abdominal foi possível observar a presença de esplenomegalia e nódulo, sugestivo de cisto/hematoma esplênico, diferencial para hematopoiese extramedular que é um dos achados supracitados relacionado a trombocitopenia, apesar disso, o diagnóstico diferencial para hiperplasia nodular, que também é comumente encontrado em cães senis não causa malefícios quando encontrados em pequenos hematomas (MCGAVIN, 2013)

Além das evidências acima, o exame citológico aliado ao histopatológico são cruciais para o diagnóstico definitivo, entretanto, por escolha da tutora, as análises histopatológicas não foram realizadas. No entanto, a elaboração da citologia, além de um processo pouco invasivo e de rápida realização, é um procedimento válido para o diagnóstico de HSA (FREITAS *et al.*, 2019). Ademais, assim como nos achados de Mullin (2019) a coleta foi realizada por PAF evidenciando assim, como neste relato, a presença de infiltrado eritrocitário, núcleos ovais e nucléolos proeminentes além do citoplasma abundante biofílico. Outrossim, é descrita também baixa celularidade, presença de células de formato fusiforme, cromatina proeminente e grosseira e achados de células de origem mesenquimal (CHOI, 2019; SUBAPRIYA, 2020). Para mais, a presença de pontos hemorrágicos somados aos demais achados supracitados apontam os aspectos citológicos do Hemangiossarcoma (MEIDEIROS *et al.*, 2013; FREITAS *et al.*, 2019).



Conclusão

Conclui-se que a paciente a qual apresentava nódulo mamário foi submetida a exames avaliativos e citológicos que evidenciaram as características de Hemangiossarcoma, além dos achados ultrassonográficos levantarem suspeita de metástase esplênica, por fim, a paciente teve boa recuperação ao fim dos cuidados pós operatórios.

Referências

- CHOI, E. W., Deep dermal and subcutaneous canine hemangiosarcoma in the perianal area: diagnosis of perianal mass in a dog - case report, **BMC Veterinary Research** (2019) 15:115
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-1852-6>.
- CRUVINEL, M.G.C., CASTRO, C.H.V. Disfunção Diastólica: Sua Importância para o Anestesiologista. **Rev Bras Anesthesiol** 2003; 53: 2: 237 - 247.
- DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. Oncologia em cães e gatos. **Editora Roca**, 2ª Edição, 766p. 2016.
- FILHO, A. F. L., LAINETTI, P. F., CYRINO, M. A., KOBAYASHI, P. E., COSTA, C. D., CAMARGO, L. S., & FONSECA-ALVES, C. E. Primary diffuse mammary hemangiosarcoma in a female dog. **Braz J Vet Pathol**, v. 11, n. 3, p. 102-107, 2018.
- FILHO, M. Â. I. C., DE SOUSA LINS, A. C., MENDES, Y. C. M., DA SILVA, T. A. S., SILVA, F. L. B., DE CASTRO FILHO, A. J., & DA SILVA LIMA, D. J. Hemangiossarcoma em cão: Relato de caso. **PUBVET**, Maringá, v.16, n.07, a1154, p.1-5, Julho., 2022.
- FREITAS, J., YI1, L.C., FORLANI, G.S. Hemangiossarcoma canino: revisão. **PUBVET**, Maringá, v.13, n.8, a389, p.1-9, Agosto, 2019.
- HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. Embriologia Veterinária. 1. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2012. 472 p.
- MEDEIROS, A. A., SOARES, N. P., MAGALHÃES, G. M., DE SOUSA, M. V. C., MACHADO, R. S. P., & SZABÓ, M. P. J. Hemangiossarcoma mamário em cadela - relato de caso. **PUBVET**, Londrina, V. 7, N. 25, Ed. 248, Art. 1643, Suplemento 1, 2013.
- MULLIN, C., CLIFFORD, C. A., Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. **Vet Clin Small Anim** - (2019) – <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.009>.
- SUBAPRIYA, S., VAIRAMUTHU, S., PAZHANIVEL, N., SHAFIUZAMA, M., and SANDHYA BHAVANI, M. Pathology of cutaneous hemangiosarcoma in dogs - **Journal of Entomology and Zoology Studies** 2020; 8(3): 167-16.
- ZACHARY, JAMES F.; MCGAVIN, M. Donald. (ed). **Bases da Patologia em Veterinária**. 5ed, Elsevier, 2013.



INFECÇÃO NO TRATO URINÁRIO (PRÓSTATA) DE UM CANINO COM A PRESENÇA DE *Escherichia coli* E *Proteus spp*: RELATO DE CASO

URINARY TRACT (PROSTATE) INFECTION OF A CANINE WITH THE PRESENCE OF *ESCHERICHIA COLI* AND *PROTEUS SPP*: CASE REPORT

Beatriz Rosa SILVA^{1*}; Lana Caroline da Costa CARDOSO¹; Andressa Letícia Rocha BRANCO¹;
Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO²; Karina Emily Vieira dos SANTOS²; Saulo Autran Moura
PALHA²; Sebastião Tavares Rolim FILHO³; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO³

¹Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará,
Brasil.

*e-mail: beatrizrosamv@gmail.com

²Residente, Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira (HOVET), Universidade Federal Rural da Amazônia
(UFRA), Belém, Pará, Brasil.

³Docente, Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA), Universidade Federal Rural da Amazônia
(UFRA), Belém, Pará, Brasil.

Abstract

The prostate is the only accessory sex gland present in male dogs. This region is extremely susceptible to the development of disturbances. These conditions are commonly detected in the clinical routine of small animals, thus, the diagnosis is based on clinical signs and complementary exams. The treatment of these pathologies is carried out according to the degree of the disease, therefore, the correct detection of the disease is strictly necessary for the appropriate intervention and, consequently, success in the treatment. In view of this, this work aims to present the clinical and laboratory findings of a male canine, pitbull breed, 5 years old, not neutered, treated at the Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira (HOVET) of the Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), and, diagnosed with prostatomegaly with differential for benign prostatic hyperplasia and bacterial prostatitis caused by the manifestation of two etiological agents *Escherichia coli* and *Proteus spp*, identified after bacterial culture of the hemorrhagic prostatic fluid expelled by the animal's penis.

Keywords: animal reproduction, prostatitis, hyperplasia.

Introdução

Os cães machos apresentam apenas uma glândula sexual acessória, a próstata. Esse órgão em análise é composto por tecido glandular e estromal responsável por envolver a uretra no colo da vesícula urinária (BARSANTI, 1992). Fisiologicamente, é responsável pela produção de fluidos que estabelecem condições favoráveis à sobrevivência e motilidade dos espermatozoides durante a ejaculação. Além disso, a localização desta glândula pode variar de acordo com a distensão da bexiga com fatores relacionados à idade ou alterações patológicas.



A próstata nos animais mamíferos domésticos, com destaque, em caninos, apresenta maior relevância clínica, uma vez que, inúmeras afecções podem prejudicá-la, principalmente distúrbios inflamatórios e infecciosos, como é o caso das prostatites.

A região prostática, em condições normais apresenta mecanismos responsáveis pela proteção contra colonização e proliferação bacteriana. Segundo Barsanti (1995), a contaminação dessa região pode ser proveniente da uretra, devido à sua proximidade anatômica, além de associação etiológica hematogena ou seminal, disseminando assim, a contaminação de forma ascendente, através do trato urinário.

A principal bactéria responsável pela manifestação da prostatite é a *Escherichia coli*, porém outros organismos como *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pasteurella sp.*, *Klebsiella spp.*, *Mycoplasma canis* e *Enterobacter sp.* também podem ser classificados como agentes etiológicos de origem primária ou secundária (RIFKIN, 1990). Com base nos estudos realizados por LEAV *et al.* (2001), esta afecção é comumente diagnosticada em animais não castrados. Ademais, faz - se necessário uma análise minuciosa para escolha da intervenção clínica adequada, pois, esse distúrbio pode estar associado com patologias multifatoriais, portanto, o protocolo de mediação deve ser moldado de acordo com o grau da enfermidade, aguda, focal ou difusa, ou crônica (DI SANTIS, 2007).

Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo relatar o caso clínico de um cão macho diagnosticado com hiperplasia prostática benigna associada com prostatite bacteriana, infecção prostática, ocasionada por *Escherichia coli* e *Proteus spp.*

Descrição do caso

O caso relatado refere - se ao atendimento de um canino macho da raça pitbull, de 5 anos de idade, não castrado, no Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira (HOVET) localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) na cidade de Belém, Pará.

Durante a anamnese, tutora relatou que o paciente apresentava quadro constante de sangramento pelo pênis, com evolução intermitente, durante o período de dezembro de 2021 a janeiro de 2022, o mesmo realizava comportamento de lambedura na região peniana e evidenciava disquesia moderada. Foi informado que anteriormente o animal realizou tratamento para



hemoparasitose e diagnóstico para prostatomegalia e trombocitopenia. No entanto, mesmo com a redução, o animal permaneceu apresentando secreção sendo expelida pela uretra, associado com apatia. O canino estava com as vacinas e vermifugações atrasadas, possui acesso a rua somente no período de passeios. Ao exame clínico, o paciente apresentava mucosas normocoradas e parâmetros cardiovasculares e respiratórios dentro da normalidade.

Como exames complementares, foram solicitados hemograma, bioquímica sérica, radiografia torácica e ultrassonografia abdominal. Na radiografia do tórax, não foram apresentadas alterações dignas de nota. Já em ultrassonografia abdominal, o fígado e baço apresentaram dimensões acentuadamente aumentadas, além disso, a próstata apresentou aumento significativo (6,2 cm x 4,2 cm x 6,4 cm), com o parênquima prostático evidenciando contornos irregulares, com definição dos bordos, como impressão diagnóstica para prostatomegalia com diferencial para hiperplasia prostática benigna e prostatite.

Foi solicitado cultura bacteriana e antibiograma do líquido prostático hemorrágico expelido pelo pênis do animal, por intermédio de um swab utilizado para coleta da secreção peniana, com isolamento de dois ou mais microrganismos na amostra, a qual foi detectada presença de duas bactérias do gênero *Escherichia coli* e *Proteus spp.* Após o resultado do antibiograma foi prescrito a Enrofloxacin 5 mg/Kg, VO, SID, fármaco que apresenta ação contra bactérias gram - negativas e algumas gram - positivas. Além disso, o paciente foi encaminhado para ser submetido à orquiectomia terapêutica e recomendado o acompanhamento clínico mensal.

Discussão

A hiperplasia prostática benigna (HPB) consiste no aumento anormal da glândula acessória presente nos mamíferos domésticos, a próstata, decorrente de estímulos hormonais constantes por meio de hormônios andrógenos (DIAS *et al.*, 2002). É considerada uma patologia comumente diagnosticada em caninos machos, não castrados e com idade igual ou superior a 6 anos (SHIMOMURA *et al.*, 2009). É comum a identificação da proliferação epitelial com leve comprometimento estromal, no entanto, dependendo do grau da enfermidade, o distúrbio pode ocasionar obstrução do reto, cólon e uretra, desencadeando reações fisiopatológicas como a retenção urinária, sangramento ou corrimento uretral transparente, tenesmo e hematúria. Ao decorrer da anamnese, a tutora relatou que o animal apresentava quadro de disquesia no momento



da evacuação, o que pode estar intrinsecamente relacionado à obstrução do canal pélvico devido ao aumento prostático.

Após a análise dos exames complementares, foi possível identificar que o animal apresentava prostatite associada com o quadro de hiperplasia prostática benigna. Segundo Gadelha (2008), a HPB é uma das causas principais para o desenvolvimento de infecções prostáticas. A prostatite consiste na infecção da próstata podendo ser classificada como aguda ou crônica (JONES *et al.*, 2000). Sendo a primeira, respectivamente, uma inflamação difusa ou focal, possuindo tendência para formação de abscessos, já a segunda, ocasionada como resultado da perpetuação da prostatite aguda ou desenvolvida de forma insidiosa, deste modo, a manifestação só é identificada após a evolução da doença em um estágio considerado avançado.

De acordo com Rifkin (1990), a etiologia da prostatite bacteriana envolve a proliferação de bactérias gram positivas e gram negativas, das quais, a *Escherichia coli* é classificada como agente mais frequente, ademais, o *Proteus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Pseudomonas spp.*, *Pasteurella sp.*, *Klebsiella spp.*, *Mycoplasma canis* e *Enterobacter sp.* também são agentes importantes na epidemiologia da doença. Após o encaminhamento do líquido prostático hemorrágico para análise laboratorial, foi identificado a presença de *Escherichia coli* e *Proteus sp.*, logo, conclui-se, que bactérias associadas foram os agentes etiológicos responsáveis pela manifestação da prostatite no animal.

As informações apresentadas com base na literatura corroboram com as manifestações clínicas evidenciadas no paciente, como dor, apatia, presença de secreção sanguinolenta e exsudato provenientes do canal uretral, são fatores característicos em pacientes acometidos com a fase aguda da doença exposta.

O tratamento da prostatite bacteriana é realizado a partir de antibioticoterapia. O fármaco deve ser prescrito com base no antibiograma para realização de um protocolo farmacológico adequado. Além disso, a orquiectomia é uma prática cirúrgica recomendada por atuar como fator preponderante para a amenização da hipertrofia prostática (BRANDÃO *et al.*, 2006). No caso abordado, o canino foi encaminhado para realização da orquiectomia, visando a minimização do quadro e, com base no resultado do antibiograma, foi estabelecido uma prescrição apropriada para o tratamento.



Conclusão

Com base no relato, pode - se concluir que as enfermidades que acometem a próstata são recorrentes na clínica de pequenos animais, com ênfase nos caninos machos, que, segundo a literatura, é classificada como a espécie mais susceptível ao desenvolvimento de patologias reprodutivas prostáticas. Como método de tratamento terapêutico adotado no estudo apresentado é aconselhável a intervenção cirúrgica, a orquiectomia, visando a redução do quadro de prostatomegalia e a prescrição de antimicrobianos, após o antibiograma, objetivando a suspensão da proliferação bacteriana responsável pelo quadro de prostatite. Por esse motivo, o diagnóstico precoce é imprescindível para o sucesso do tratamento.

Referências

- BARSANTI, J. A.; **Canine prostatic diseases**. In ETTINGER S.J; Textbook of veterinary internal medicine. Philadelphia: Manole, 1989 p. 1859 - 1880.
- BRANDÃO, C. V. S., *et al.* Orquiectomia para redução do volume prostático. Estudo experimental em cães. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, p. 7-9, 2006.
- DIAS, M. B. M. C.; LIMA, E. R.; ALMEIDA, E. L.; MENEZES, M. M.; AZEVEDO, M.S.; GALAMBA, O. T.; SANTO, C. C. E; ALENCAR, B. B.; FLORENCIO, E. V. M. Hiperplasia prostática benigna - relato de caso. **Revista V** (n): pp 1-ppf 2002.
- DI SANTIS GW. **Padrão histopatológico, perfil imunoistoquímico e potencial pré-maligno das lesões displásicas da próstata canina**. 2007. 114 f. Tese (Doutorado em Patologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.
- LEAV, I.; SCHELLING, K. H.; ADAMS, J. Y.. Role of canine basal cells in prostatic post natal development, induction of hyperplasia, sex hormone stimulated growth and the ductal origin of carcinoma. **Prostate** 47:149-163, 2001.
- RUBIN S.I. Localizing bacterial infection to the prostate gland. **Vet Med.**, 85:366-378, 1990.
- SHIMOMURA, J. Z.; EUGÊNIO, F. R.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Hiperplasia prostática benigna no cão: comparação de métodos diagnósticos. **Vet e Zootec.** 16 (1): 117-126, 2009.
- SMITH J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis and treatment. **Theriogenology**, v. 71, p. 375-383, 2008.



LEIOMIOMA VAGINAL EM CADELA: RELATO DE CASO

VAGINAL LEIOMYOMA IN A DOG: REPORT CASE

Beatriz de Oliveira RAMOS^{1*}; Jordana Brites JERONIMO¹; Luis Hiago Coutinho MARQUES²; Ádila Rosa Corsini SOUZA²; Luan Junio WUTKE²; João Victor de Andrade ALVES¹; Márcia Rezende FAES³; Isabel Candia Nunes da CUNHA⁴.

¹Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro (RJ) - Brasil. beatrizdeo.ramos@gmail.com

² Residente em Reprodução, Obstetrícia e Ultrassonografia de Pequenos Animais na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

³ Médica Veterinária com atuação no Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

⁴Professora responsável pelo Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

*beatrizdeo.ramos@gmail.com

Abstract

Vaginal tumors are the most frequent neoplasm of the tubular reproductive tract in bitches, with benign tumors being the most frequent in whole bitches. The present work reports a case of a female dog with vaginal leiomyoma, treated at the Veterinary Hospital of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) [State University of Northern Rio de Janeiro], with a history of vulvar protrusion with mass relapse, which was characterized as smooth, firm and pedunculated. She was submitted to ovariopelvic hysterectomy and, later, to episiotomy surgery for tumor excision, which was sent for histopathological examination. The prognosis is favorable, due to its benign character and surgical resection.

Keywords: Tumor, canine, prolapse.

Introdução

Os tumores vaginais e vulvares são as neoplasias mais frequentes do trato reprodutivo tubular em cadelas, constituindo cerca de 2 a 3% das neoplasias caninas, das quais 85 a 90% ocorrem na vagina e vulva (SUSANECK, 1981). A maioria das neoplasias vaginais são originadas de tecido muscular liso ou fibroso, sendo mais comum, em pacientes inteiras, a ocorrência de pólipos ou leiomioma, e os tumores malignos são menos comuns em fêmeas inteiras (OBRADOVICH, 2016).

O leiomioma é um tumor benigno de músculo liso (FOSSUM, 2014), o mais frequente em neoplasias vaginais e vulvares, seguido de fibroleiomioma e leiomiossarcoma (MACLACHLAN E KENNEDY, 2002). 85% dos leiomiomas ocorrem no trato reprodutivo feminino na vagina, vulva e vestibulo, mas podem ocorrer em diversos locais, como traqueia, sistema gastrointestinal, urinário e próstata (KANG; HOLMBERG, 1983).



O leiomioma é, normalmente, responsivo à atuação de estrógeno (OBRADOVICH, 2016), podendo estar associado a tumores ou cistos ovarianos (KANG; HOLMBERG, 1983), e pode regredir com a ovariectomia. Alguns tumores podem não regredir completamente, sendo necessária e aconselhada, nesses casos, a remoção cirúrgica (OBRADOVICH, 2016).

Alguns autores relatam a incidência deste tipo de tumor vaginal em animais múltiparas, mas outros relatam não ter significado estatisticamente entre nulíparas e múltiparas (KANG; HOLMBERG, 1983). Ele pode ser único ou múltiplo, intra ou extraluminal, e possui, geralmente, características como encapsulado, definido, de consistência firme (KANG; HOLMBERG, 1983). Tumores intraluminais podem protruir através da vulva (KANG; HOLMBERG, 1983).

O prognóstico do leiomioma vaginal é favorável quando o tumor é inicial, por ser tumor benigno, enquanto tumores como leiomiossarcoma, considerados malignos, podem realizar metástase (KANG; HOLMBERG, 1983).

Objetivo

O objetivo do presente trabalho é relatar um caso de tumor vaginal, em cadela de 12 anos, sem raça definida (SRD), com histórico de uso de progestágeno, retirado cirurgicamente por episiotomia e diagnosticado através de histopatologia.

Descrição do caso

Uma cadela de 12 anos, SRD, pesando 37 kg, foi atendida no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HVET-UENF) com queixa principal de prolapso vaginal. Durante a anamnese, obtiveram-se as seguintes informações: o animal não era castrado e vacinado, não possuía acesso à rua, utilizava aplicação de progestágeno como anticoncepcional constantemente, em todos os ciclos, totalizando cerca de 8 aplicações ao longo da vida.

Na avaliação física, o animal apresentava 38,9°C, FC 120 BPM, FR 116 (ofegante), mucosa normocorada. O tutor não relatou alterações de comportamento. Na inspeção visual e no exame físico, não foi identificado prolapso vaginal que, segundo o tutor, havia se retraído durante o dia. Apresentava corrimento em vulva, de aspecto serosanguinolento.

Na ultrassonografia abdominal, foi observado útero com conteúdo anecogênico, sugestivo de piometra, hemometra e mucometra, além da parede espessada e dilatada, sugerindo hiperplasia



endometrial cística. Devido ao achado ultrassonográfico, o animal foi encaminhado para o setor de cirurgia para realização de ovariectomia.

Durante o pós-cirúrgico, o animal apresentou um aumento de volume na mucosa com projeção para fora dos lábios vulvares, a qual foi reduzida e suturados os lábios vulvares. Foi retirada a sutura após 4 dias sem prolapso vaginal. A cadela retornou para o setor de reprodução 3 dias após a retirada da sutura, com edema e sangramento devido à abrasão e lambedura, gerando lesão na mucosa vaginal.

Durante a avaliação e palpação vaginal, foi identificada uma massa aderida em região de vagina, de aspecto liso, firme e pedunculada, medindo cerca de 5 cm, que realizava o prolapso (Figura 1). A massa apresentava sangramento devido à manipulação do animal. Foi realizada a redução do edema utilizando Solução de Glicose 50% e compressa gelada. O animal foi encaminhado para realização de episiotomia para ressecção da massa vaginal, posteriormente encaminhada para a histopatologia.

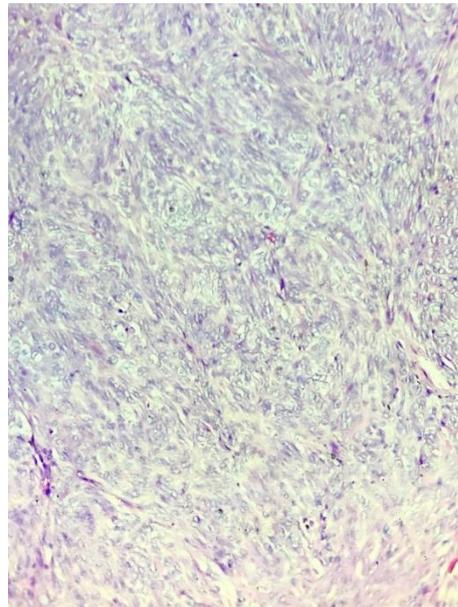
O laudo do exame histopatológico revelou neoplasia mesenquimal benigna, de células longas e robustas, citoplasma eosinofílico, núcleos alongados com extremidades arredondadas, sendo diagnosticado leiomioma (Figura 2).

Figura 1 – Leiomioma protruído pela vulva de cadela, SRD, 12 anos, apresentando lesão em região ventral da massa por abrasão e lambedura, além de sangramento.



Fonte: Arquivo Pessoal NuARC/HVET-UENF.

Figura 2 - Exame microscópico de massa em lúmen uterino, com diagnóstico de leiomioma.



Fonte: Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/HVET-UENF.

Discussão

Os leiomiomas ocorrem com maior frequência em cadelas a partir da meia-idade, podendo desenvolver nódulos solitários ou numerosos (KLEIN, 2007). O presente estudo relata a ocorrência de um único tumor em uma cadela idosa, de 12 anos.

De acordo com Klein (2007), os principais sinais relatados são aumento de volume na região perineal, prolapso de tecido através da vulva, disúria, polaciúria, tenesmo, obstrução à cópula em fêmeas intactas, descarga vulvar e piometra. Foram observados o prolapso e a secreção vulvar, provavelmente, dado o tamanho do nódulo, que ainda não causava compressão em trato gastrointestinal ou urinário, além do conteúdo anecogênico visualizado em lúmen uterino pela ultrassonografia abdominal, sugestivo de piometra, mucometra ou hemometra.

O tratamento preconizado é a retirada cirúrgica (KANG; HOLMBERG, 1983). A maioria das massas pode ser removida por ressecção local via episiotomia (THACHER; BRADLEY, 1983), como foi realizado no presente estudo. O prognóstico é considerado favorável devido à benignidade do tumor e a retirada cirúrgica.



Conclusão

O leiomioma pode estar relacionado à dependência hormonal, gerando maior ocorrência em cadelas não castradas e idosas, em consequência da exposição ao estrógeno, conforme observado neste estudo.

O leiomioma pode gerar dificuldades pelo crescimento da massa. A massa pode comprimir o trato gastrointestinal e urinário, gerando disúria e tenesmo, além da obstrução da cópula em reprodutoras, fertilização e desenvolvimento fetal, sendo capaz de gerar até mesmo uma distocia. Apesar disso, o prognóstico é favorável quando ocorre a retirada cirúrgica e a OSH.

Referências

- FOSSUM, T. **Cirurgia de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- KANG, B. & HOLMBERG, L. Vaginal Leiomyoma in a Dog: Case Report. **Can Vet J**. 24(8): 258-260. 1983.
- KLEIN, K., Tumors of female reproductive system *In*: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. WB Saunders. St.Louis, 4 ed., p. 610-618, 2007.
- MACLACHLAN, J. & KENNEDY, C. Tumors of the Genital Systems. *In*: Meuten, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing Company, 2002. Cap. 11, p. 547-573.
- OBRADOVICH, J. **Small Animal Clinical Oncology: Self-Assessment Color Review**. 1. ed. London: CRC Press, 2016.
- SUSANECK, S.J. Tumors of the female reproductive tract. *In*: **ONCOLOGY notes**. Fort Collins: Comparative Oncology Unit, Colorado State University, 1981
- THACHER, C.; BRADLEY, R.L. Vulvar and vaginal tumors in the dog: A retrospective study. **Journal of American Veterinary Association**. v. 183, n. 6, p. 690- 692, 1983.



MUCOMETRA EM CADELA POODLE EM SOBRAL-CE: RELATO DE CASO

MUCOMETRA IN POODLE BITCH IN SOBRAL-CE: CASE REPORT

Maria Janiele SANTANA¹; Francisco Hélio Pontes FILHO¹; Antonio Renilson Sousa VIEIRA²; Carlos Henrique Sousa de MELO³; Livia Correia MAGALHÃES³; Kassiana Adriano Pinto de OLIVEIRA³; Wilder Hernando Ortiz VEGA³ Celso Henrique Souza Costa BARROS³

¹Discente do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário INTA (UNINTA). Sobral, CE. Brasil.

²Médico veterinário do Hospital Veterinário de Grandes Animais do UNINTA. Sobral, CE. Brasil.

³Professor(a) do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário INTA (UNINTA). Sobral, CE. Brasil.

*E-mail:janielesantana5647@gmail.com

Abstract

Mucometra is the accumulation of sterile intraluminal mucoid fluid, and its occurrence is largely unknown as it is usually an incidental finding during ovariohysterectomy (OVH). Clinical signs are discreet and, when present, include vaginal secretion, swelling and pain on abdominal palpation, fever, apathy and pale mucous membranes. A ten-year-old female poodle weighing 10 kg of live weight with no history of pregnancy was evaluated with the aim of performing laboratory and imaging tests with suspected uterine infections, vaginal secretion, small bulge in the abdomen, without pain on abdominal palpation. In the anamnesis, the owner reported that the animal had a history of heat and brought it for evaluation, an ultrasound examination was performed for gynecological evaluation. Then, vaginal cytology was performed in order to reveal the cell population present in the vagina, during the abdominal ultrasound examination, the uterus with increased dimensions was observed. The presence of anechoic content in the uterine lumen was also observed. Ultrasonographic changes in the uterus were suggestive of mucometra.

Keywords: Bitch, ultrasound, uterine diseases.

Introdução

As doenças uterinas em fêmeas são bastante comuns na medicina veterinária, em cadelas incluem hiperplasia endometrial cística (HEH), mucometra, hidrometra e piometra podendo apresentar essas alterações de formas variadas. No caso da piometra podem apresentar fluido purulento ou hemopurulento (HAGMAM, 2014).

É bastante importante o conhecimento na clínica ginecológica, reconhecer os sinais que na maioria dos casos são sinais leves ou ausentes, em casos de mucometra/hidrometra. Já no caso de piometra, trata-se de uma doença sistêmica com presença de infecção bacteriana no útero e acarretam o comprometimento de outros órgãos não reprodutivos, principalmente os rins (MARTINS *et al.*, 2007; VERSTEGEN, 2008).

A mucometra é o acúmulo de fluido mucóide intraluminal estéril. E sua ocorrência é bastante desconhecida, pois normalmente é um descobrimento incidental durante a



ovariohisterectomia (OVH) ou esterilização ou através de exame ultrassonográfico do trato reprodutivo, ou no momento do exame físico (PRETZER SD et al., 2008; VERSTEGEN, 2008).

Os sinais clínicos são discretos e quando presentes incluem secreção vaginal, aumento de volume e dor a palpação abdominal, febre, apatia e mucosas hipocoradas (SOARES *et al.*, 2019). Na mucometra, não há infecção bacteriana, então, as fêmeas diagnosticadas não estão sujeitas a desenvolver endotoxemia e sepse induzidas pela doença uterina.

Segundo Pretzer (2008), a mucometra é uma alteração não inflamatória que afeta o útero por meio do acúmulo de fluido estéril no lúmen uterino, acometendo bastante as cadelas. Ela é caracterizada pelo acúmulo de líquido aquoso e consistente no útero. Esse acúmulo de líquido está associado a condições como: hímen imperfurado, aplasia segmentar da vagina, colo do útero e útero, e quando existe um estímulo exagerado da atividade secretora das glândulas endometriais.

O estímulo exagerado da atividade secretora das glândulas endometriais é responsável, numa fase inicial, pela produção excessiva de muco, que posteriormente, induz o aparecimento de sinais inflamatórios (PAYAN CARREIRA; PIRES, 2005).

Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo relatar um caso de mucometra canina avaliada através de exame clínico ginecológico diagnosticado mucometra.

Descrição do caso

Uma cadela da raça poodle, com dez anos de idade, pesando 10 kg de peso vivo sem histórico de gestação foi encaminhada ao HOVET UNINTA para avaliação no dia 22/08/2022 objetivando a realização de exames complementares com suspeita de infecções uterinas. Na anamnese, a proprietária relatou que o animal apresentou histórico de cio recente e solicitou a avaliação.

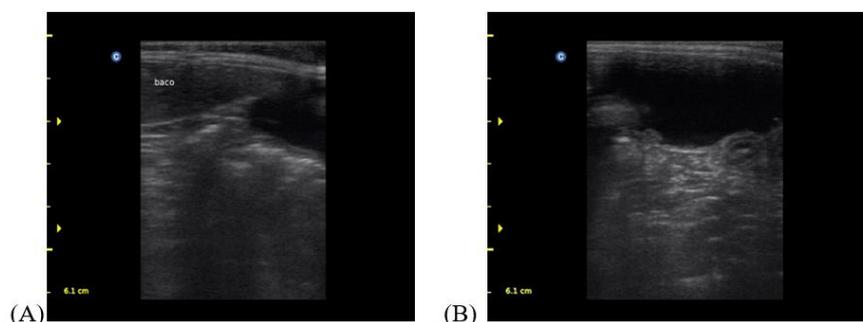
Na avaliação clínica o animal apresentou temperatura retal de 39,1°C, frequência cardíaca de 84 batimentos por minuto e frequência respiratória de 50 movimentos respiratório por minuto, mucosas normocoradas, tempo de preenchimento capilar (TPC) 2 segundos, tempo de perfusão capilar menor que 3 segundos. Além de secreção vaginal e pequeno abaulamento no abdômen, sem dores na palpação abdominal.

Foi realizada a citologia vaginal com o intuito de revelar a população celular presente na vagina e determinação da fase do ciclo estral. Com o auxílio de swab introduzido em ângulos, inicialmente de 45° e depois 180° para que se obtivesse material da região mais cranial possível da vagina, logo depois o material coletado foi fixado em lâminas microscópicas através de esfregaços. As lâminas foram coradas com corante do tipo panótico rápido (LABORCLIN). Após feita a coloração e secagem das lâminas, cada lâmina foi submetida à microscopia óptica com aumento de 40x para avaliação de células parabasais, intermediárias, superficiais e anucleadas. Sendo detectado a predominância de células intermediárias, sugestivo do animal se apresentar na fase do ciclo estral de Diestro, foi colhida amostra de sangue para a realização de exames hemograma, não sendo constatadas alterações nos valores referenciais.

Foi realizado exame ultrassonográfico dentro da avaliação ginecológica. A paciente foi colocada em posição decúbito dorsal, em seguida foi realizada uma tricotomia ampla no abdômen entre a região epigástrica e hipogástrica da paciente e logo após a tricotomia foi aplicado gel próprio para ultrassonografia. Foi utilizado aparelho de ultrassonografia (Chison Eco1) com transdutor eletrônico e probe linear a frequência utilizada foi de 7,5 MHz.

Durante o exame de ultrassom abdominal (Figura 1) foi observado o útero com dimensões aumentadas, também foi observada a presença de conteúdo anecóico no lúmen uterino, as alterações ultrassonográficas em útero foram sugestivas de mucometra.

Figura 1 - Descrição do exame ultrassonográfico do útero (A) Baço à esquerda e útero a direita. (B) Útero da cadela.



Discussão

A paciente do caso em questão não cursa com os achados de literatura em relação a faixa etária, pois, segundo Aguirra (2013) não foram observados trabalhos que indiquem a incidência



desta alteração uterina em cadelas, contudo, cadelas acima de seis meses e menor ou igual a três anos, nulíparas e que fizeram uso de contraceptivos são acometidas por mucometra. Essa enfermidade, em cadelas, possui literatura escassa em relação à idade, número de partos e uso de contraceptivos. Deste modo, Pena *et al.* (2006) relataram um caso de mucometra em cadela de seis anos. Pretzer (2008) cita que fêmeas não submetidas a reprodução são mais predispostas a desenvolver mucometra e Mendonça *et al* (2008) relataram que cadelas que fazem uso contínuo de contraceptivos, pode levar ao desenvolvimento dessa lesão uterina. A faixa mais acometida é acima de três anos e abaixo de seis anos, no presente estudo a paciente estava com 10 anos, porém não possuía histórico de gestações o que pode ter sido um fator predisponente. Após o diagnóstico presuntivo através do exame clínico da paciente, somado aos achados citológicos e ultrassonográficos, o animal foi encaminhado para tratamento cirúrgico, mediante o procedimento de ovariosalpingohisterectomia (OSH).

Conclusão

A mucometra é uma alteração patológica em cadelas, que tem relação com diferentes fatores não bem elucidados na literatura, portanto a avaliação ginecológica de rotina utilizando a ultrassonografia e citologia deve ser considerada como prática para identificar precocemente possíveis patologias reprodutivas como mucometra, no qual podem prejudicar a reprodução e ocasionar transtornos sistêmicos no animal devido a possibilidade de proliferação bacteriana no conteúdo mucoso uterino, desencadeando futuramente a piometra, além de causar destruição da mucosa endometrial, resultando em infertilidade.

Referências

AGUIRRA L.R.V.M., PEREIRA W.L.A., MARSOLLA E.H. Ocorrência e aspectos macro e microscópicos da mucometra em cadelas. **Vet. e Zootec.** v.22, n.1, p. 83-88, 2015.

COSTA, ÁLISON DE SOUZA. **Estudo retrospectivo e in vitro da resposta imune uterina em cadelas com desordens reprodutivas no município de Uberlândia** - MG. 2018. 75 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

FRIOLANI, MILENA. **Utilização do perfil bioquímico-sérico, incluindo proteínas de fase aguda, como método auxiliar diagnóstico e prognóstico em fêmeas caninas acometidas por mucometra e piometria**, -Jaboticabal, 2017, p.109.



MARTINS, D.G. **Complexo hiperplasia endometrial cística/piometra em cadelas: fisiopatogenia, características clínicas, laboratoriais e abordagem terapêutica.** 2007. 54 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

PENA F.J., GINES J.A., DUQUE J., VIETINEI V., MARTINEZ-PEREZ R., MADEJON L., et al. **Endometrial Adenocarcinoma and Mucometra in a 6-year-old Alaska**

PRETZER S.D. Clinical presentation of canine piometra and mucometra: A review. **Theriogenology.** v.70, n.3, p.59-363, 2008.

SANTOS B.H., TOYDEMIR F.T, ERDOGAN O., SENNAZILE G., EKICI H. Inguinal herniation with hydrometra/mucometra in a poodle bitch. **Can Vet J.** v.54, n.9, p. 840-844, 2013.

VERTEGEN J., DHALIWAL G., et al, Mucometra, cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriogenology.** v.70, n. 3, p.364-374, 2008.



MUMIFICAÇÃO FETAL EM CADELA: RELATO DE CASO

FETAL MUMMIFICATION IN A BITCH: A CASE REPORT

Maria Antônia Moreira MACIEL^{*1}; Jeicielly Oliveira SANTOS¹; Alexandra Soares RODRIGUES¹; Deusdete Conceição GOMES JÚNIOR¹

¹Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil.

*E-mail: maria.m8290@ufob.edu.br

Abstract

The objective of this work is to detail a case of fetal mummification in a female dog. A mixed-breed female dog was attended at the Veterinary Hospital of the Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Campus Barra, with a history of bloody vulvar secretion, without changes during the clinical examination. In the ultrasound examination, structures compatible with the skull and spine, without heartbeats, suggestive of mummified fetuses, were observed in the uterus, in addition, a fetus in normal physiological development was observed, being viable. The patient underwent pathological emergency cesarean section followed by ovariohysterectomy. During the surgical procedure, torsion of the right uterine horn was noted, the viable fetus was removed but died. In the macroscopic evaluation of the uterus, it was possible to visualize the lumen of the two uterine horns, markedly distended and filled with blackish brown gelatinous content, adhered to the endometrium, and it was possible to distinguish six mummified fetuses without the presence of fetal fluids and occasionally surrounded by maternal-fetal tissues. Among the possible causes of mummification, uterine torsion is described, causing compression of the uterine vessels and consequently of the maternal-fetal supply, causing fetal death and subsequent mummification, corroborating the findings in the present study. After the surgical procedure, the dog had a good recovery. The monitoring the final period of pregnancy, and early diagnosis, increases the chances of successful treatment and ensures the animal's well-being. For this, it is necessary for the tutor to monitor the animal's labor, and seek the professional for the correct conduct appropriate for each case.

Keywords: Dystocia, Fetal death, Mummification, Uterine torsion.

Introdução

A mumificação fetal é uma condição que ocorre no útero na fêmea gestante, a partir da morte do conceito, após a ossificação no terço final da gestação, onde se tem a reabsorção incompleta e desidratação dos tecidos do feto morto, que permanece retido no lúmen uterino (SCHIOCHET, 2007). Essa condição patológica acontece somente em situação em que a cérvix permanece fechada com ausência dos microrganismos que promovem a lise do tecido morto no ambiente uterino (PRESTES *et al.*, 2017).

Os fetos mumificados podem se apresentar de duas formas: hemático ou papiráceo. O feto mumificado hemático se apresenta com material marrom e viscoso encobrindo o feto. Já na



mumificação do tipo papiráceo, a parede uterina e membranas fetais ficam aderidas, tornam-se secas, duras, enrugadas, sem exsudato, conferindo com a nomenclatura, possuindo aspecto de pergaminho (LEFEBVRE, 2015).

A ultrassonografia é um método de eleição diagnóstica para patologias fetais, por ser eficiente para avaliação da viabilidade fetal, além de detectar possíveis anormalidades da gestação e dos fetos, possibilitando a definição de um prognóstico mais preciso (FELICIANO *et al.*, 2007). A mumificação tem sido relatada em várias espécies, mas, é comumente citada em bovinos, em caninos, é de natureza esporádica (ROBERTS, 2004). Dessa forma, o presente relato tem como objetivo detalhar um caso de mumificação fetal em uma cadela.

Descrição do caso

Foi atendido no Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal do Oeste da Bahia (HVU-UFOB), um canino, fêmea, 21,800 kg de peso, sem raça definida (SRD) de médio porte, de um ano e seis meses de idade e com histórico de acasalamento, com queixa de apresentar secreção vaginal de coloração sanguinolenta há cinco dias. Quando perguntado sobre o uso de anticoncepcional, foi relatado que não havia sido aplicado.

Ao exame físico, foi observado um discreto aumento abdominal, secreção transparente na vulva e não foram contatadas demais alterações nos parâmetros fisiológicos. Foi solicitada ultrassonografia abdominal para auxílio no diagnóstico.

No exame ultrassonográfico do abdome, observou-se presença de estruturas fetais compatíveis com crânio e coluna, sem líquidos fetais, indicando fetos inviáveis, sem batimentos cardíacos, sendo sugestivo de mumificação fetal. Houve visualização de um feto viável, com formação óssea completa, diâmetro biparietal com média transversal de 2,3 cm e batimentos cardíacos com média de 230 bpm.

Foi constatado que a paciente se encontrava em período final de gestação e apresentando distocia de ordem fetal, sendo encaminhada para a cirurgia de cesariana de emergência patológica, com provável diagnóstico de mumificação fetal. Após a anestesia e antisepsia da paciente, se iniciou o procedimento cirúrgico.

Durante o acesso cirúrgico o útero apresentava aumento de volume de ambos os cornos, sendo visualizada torção do corno direito. Os ovários apresentavam-se com coloração e tamanho normais, compatíveis com a gestação. A torção foi desfeita e o útero exteriorizado. Realizou-se incisão no corno uterino esquerdo e pode-se identificar a presença de um feto aparentemente



viável, o mesmo foi removido e se concluiu os cuidados com neonato, sendo feito rompimento da placenta e ligadura do cordão umbilical, assim como limpeza, secagem e estímulo torácico por massagem, mas o filhote não respirava, vindo a óbito em cerca de 30 minutos.

Após se realizar a Ovariohisterectomia (OH) o material coletado foi direcionado ao setor de patologia animal do HVU-UFOB, para a avaliação macroscópica do útero. Dessa forma, pode-se visualizar o lúmen dos dois cornos uterinos marcadamente distendidos e repletos de conteúdo gelatinoso de coloração marrom enegrecido, aderido ao endométrio, após a dissecação foi possível distinguir seis fetos mumificados aderidos em processo de autólise, sem a presença de líquidos fetais e ocasionalmente envoltos por tecidos materno-fetais. O pós-cirúrgico da fêmea foi satisfatório e evoluiu para uma boa recuperação.

Discussão

Quanto às possibilidades de morte fetal seguida de mumificação, o uso de progestágenos é um dos principais fatores (PRESTES *et al.*, 2017). O emprego do mesmo foi negado pelo proprietário do animal durante a anamnese o que pode sugerir outras causas como a ruptura uterina, gestação ectópica, atonia uterina e torção uterina, sendo estas patologias associadas a sinais clínicos diversos (BINDARI; SHRESTHA, 2012; CRUZ *et al.*, 2016; MUDASIR *et al.*, 2012; MYUNG *et al.*, 2016; PRESTES *et al.*, 2017; SABUNCU *et al.*, 2013; SONI *et al.*, 2018; TONIOLLO *et al.*, 2003; VOORWALD *et al.*, 2012).

Na realização do exame físico não foram constatadas alterações nos parâmetros fisiológicos da paciente. De acordo com Lefebvre (2015), a mumificação fetal é uma doença silenciosa que não demonstra alterações no estado geral do animal, sendo diagnosticada de forma ocasional durante uma cirurgia abdominal. Todavia, a maioria dos casos de mumificação fetal em cadelas já relatados, possuem alterações observáveis, como, ruptura uterina, acúmulo de fluido intrauterino, processo infeccioso sistêmico, descargas vaginais, anorexia, febre. Discordando de alguns casos descritos na literatura, no presente caso, a suspeita era de gestação sendo confirmada alterações compatíveis com inviabilidade fetal parcial e suspeita de mumificação no exame ultrassonográfico, e posteriormente encontrada torção uterina somente ao acesso cirúrgico (AHUJA *et al.*, 2017; BINDARI; SHRESTHA, 2012; CRUZ *et al.*, 2016; SABUNCU *et al.*, 2013; SUNDER; KHAN, 2014).

No paciente em questão, a suspeita era de gestação, sendo solicitado exame ultrassonográfico para acompanhamento gestacional. Durante a ultrassonografia observou-se a presença de um feto



viável que foi compatível com terço final de gestação, além de estruturas compatíveis com fetos inviáveis. Outros autores relataram situação similar ao observado neste estudo, onde foi visualizada através de exames de imagem, em cadelas ou gatas, a presença de fetos vivos e fetos mumificados (SAROJ KUMAR YADAV *et al.*, 2021; AHUJA *et al.*, 2017; VIKRAM *et al.*, 2015). Estipula-se que a presença de fetos mumificados não interfira na viabilidade de outros fetos vivos (AHUJA *et al.*, 2017) e que as condições necessárias para a ocorrência da mumificação fetal incluem a manutenção do feto morto dentro do útero pela presença de um ou mais fetos normais viáveis (PRESTES *et al.*, 2017; ROBERTS 2004).

A torção uterina do corno direito da cadela, foi evidenciada somente ao realizar o procedimento cirúrgico de cesariana, sendo considerada um fator predisponente para morte fetal e mumificação consequente (PRESTES *et al.*, 2017; TONIOLLO *et al.*, 2003). No presente estudo, possivelmente a ocorrência da torção promoveu a interrupção do aporte sanguíneo para os fetos causando a morte, não ocorrendo contaminação bacteriana, ficando os conceptos retidos no útero em estado de mumificação. Ressalta-se que o diagnóstico da torção uterina normalmente é realizado no ato cirúrgico, pois o exame de ultrassonografia geralmente é inespecífico (SILVA *et al.*, 2019).

No caso descrito, seis fetos mumificados foram retirados dos cornos uterinos da cadela, entre eles, um feto vivo viável. Casos semelhantes têm sido relatados ocasionalmente em cadelas (AHUJA, 2017; ROBERTS, 2004; VIKRAM *et al.*, 2015).

Conclusão

A mumificação fetal em cadelas é esporádica e há poucos relatos na literatura. O monitoramento do período final da gestação e diagnóstico precoce aumenta as chances de sucesso no tratamento e assegura o bem-estar do animal. Para isso, é necessário o tutor acompanhar o trabalho de parto do animal, e procurar o profissional para a conduta adequada para cada caso.

Referências

- ANKIT KUMAR AHUJA, A.K.; SINGH, NARINDER KUMAR; MUDDRANGIAH. 2017. Mummified Fetus and Two Live Fetuses in Labrador Bitch: A Special Case. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.*6(7):xx-xx.
doi:<http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.607.0xx>
- BINDARI YR; S SHRESTHA, 2012. Canine fetal mummification. *Inter J Vet Sci*, 1(1): 10-12.



CRUZ, T.P.P.S.; LIMA, S.R.; TRAVAGIN, D.R.P.; PESCADOR, C.A.; SOUZA, R.L. Agenesia ovariana e de corno uterino acompanhada por mumificação fetal ectópica em canino - Relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, n.139, 2016.

FELICIANO, M. A. R; VICENTE, W. R. R; LEITE, C. A. L; MUZZI, L. A. L. Novas perspectivas no diagnóstico ultra-sonográfico gestacional em cadelas, revisão de literatura, Revista, clínica veterinária, ano 8, n.73, p. 56-60, 2008.

LEFEBVRE, R.C. Fetal mummification in the major domestic species: current perspectives on causes and management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, v.2015, n.6, p.233- 244, 2015.

MUDASIR, Q.; SHAH, K.A.; NYRAH, Q.; ANDRABI, A. 2012. Fetal Mummification in Bitch. *Vet. Scan*, 7(1): 97-99.

MYUNG, H.W.; LEE, A.J.; KIM, J.Y.; KIM, J.H.; EOM, K.D.; KIM, H.J.; DO, S.H.; KIM, H.Y.; CHUNG, D.J. Secondary abdominal pregnancy with fetal mummification diagnosed using computed tomography in a dog: a case report. **Veterinaria Medicina**, v.61, n.1, p.51–55, 2016.

PRESTES, N. C.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. (2017). *Obstetrícia veterinária*. Grupo Gen-Guanabara Koogan.

ROBERTS, S.J. 2004. *Veterinary Obstetric and Genital Disease*. 2nd edition. CBS Publishers and Distributors, India.

SABUNCU, A.; GUNAY, Z.; UÇMAK, M.; ENGINLER, S.O.; ERZENGIN, O.M.; KURBAN, I.; KAHRAMAN, B.B. Different sizes and degrees of fetal mummification during pregnancy in a dog: a case report. **International Journal Veterinary Science**, v.2, n.2, p.75-77, 2013

SAROJ KUMAR YADAV *et al.* "Fetal Mummification in a Cat". *Acta Scientific Veterinary Sciences* 3.1 (2021): 19-22.

SCHIOCHET, F.; BECK, C. A. C.; PINTO, V.; STEDILE, R.; CONTESINI, E.; ALIEVI, M. M.; YAMAZAKI, P. H.; JURINITZ, D. F.; BERNARDES, S. B. L. Ovário-histerectomia laparoscópica em uma gata com fetos mumificados- relato de caso. **Revista portuguesa de ciências agrárias**, 2007.

SILVA, L. A. C. *et al.* Torção uterina unicornual em cadela não gestante. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 47, 2019. Suplemento 1.

SUNDER, S.; KHAN, A. Ultrasonography Diagnosis of Foetal Mummification in a Bitch – Case report. *Pet Practitioners Journal*, p.11-12, 2014. Disponível em <http://www.petjournal.com/casereportcontents.html>. Acessado em 20/03/2016.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. (2003). **Manual de obstetrícia veterinária**. Varela.

VIKRAM R, CHAUDHARY GR, SIVANARAYANANA TB, SUSHOBHIT S, NARAYANAN K. Successful treatment of fetal mummification in a bitch by caesarean section: a case report. *Theriogenology Insight - An Int J Reprod All Anim.* (2015) 5:147–51. 10.5958/2277-3371.2015.00016.9 - [DOI](#).



MUMIFICAÇÃO FETAL EM GESTAÇÃO GEMELAR EM EQUINO (RELATO DE CASO)

FETAL MUMMIFICATION IN TWIN PREGNANCY IN EQUINE (CASE REPORT)

Thayná Santiago de SOUZA^{1*}; João Carlos da Silva CARNEIRO²; Marcus Vinicius Oliveira GONÇALVES³; Rodrigo de Souza AMARAL⁴

¹Acadêmica do curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM, Manaus, AM, Brasil. ²Acadêmico do curso de Medicina Veterinária da Escola Superior Batista do Amazonas – ESBAM, Manaus, AM, Brasil. ³Médico Veterinário da clínica North Horse AM, Manaus, AM, Brasil. ⁴Laboratório de Morfofisiologia e Reprodução Animal – LaMoRA, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM, Manaus, AM, Brasil.

*thaynasantiago.ifam@gmail.com

Abstract

The present article reports the mummification of one of the fetuses of twin pregnancy in a Quarter horse mare. The animal was directed to a reproductive evaluation to start breeding management; however, the mare was diagnosed as ten-month pregnant. After foaling, the mare was evaluated to be directed to an artificial insemination procedure. During the examination, a mummified fetus was observed. The treatments with prostaglandin and manual extraction were unsuccessful. The mare did not present any clinical alteration; therefore, we opted to carry out a cesarean section after weaning the foal.

Keywords: reproduction, mare, gestation.

Introdução

A mumificação fetal é uma enfermidade reprodutiva que acarreta em perdas econômicas a pecuária, pois aumenta o período gestacional e provoca perda fetal (MOYA-ARAUJO, 2016). Esta patologia é uma alteração decorrente da morte do feto de forma asséptica, com a sua reabsorção incompleta (SCHIOCHET *et al.*, 2007). A mumificação fetal ocorre após a formação da placenta, no período de calcificação, por um mecanismo inespecífico de desidratação dos tecidos moles nos fetos retidos no útero, que recebem a deposição de cálcio (BRAGA; BARROSO, 2014).

Após a morte fetal, os fluidos amniótico e alantóide são reabsorvidos, resultando na desidratação dos tecidos fetais e das membranas anexas (LEFEBVRE *et al.*, 2009), não seguido pelo parto, mas pela retenção em um ambiente estéril, pois as bactérias não entram no lúmen uterino durante esse processo (THRELFALL, 2005).

Nas éguas, geralmente ocorre entre o 3º e o 8º mês de gestação, após o início da ossificação fetal (PIZZIGATTI *et al.*, 2012), mas comumente durante o segundo trimestre (SAMPER *et al.*, 2007), sendo a causa mais frequente a gestação gemelar. A maioria das gestações gêmeas



resultam em aborto, contudo em casos raros um dos fetos pode mumificar e outro não, continuando, assim, a gestação (MOREIRA, 2015).

Objetivo

O presente artigo tem por objetivo relatar um caso de mumificação fetal durante uma gestação gemelar em uma égua da raça Quarto de Milha, com o nascimento de um potro viável.

Descrição do caso

Uma égua, da raça Quarto de Milha, com aproximadamente 12 anos de idade e 500 kg, foi levada para a fazenda Gavião, localizada no município de Iranduba, no Estado do Amazonas, para reprodução. Conforme expectativa do proprietário, a fêmea entraria no cio em aproximadamente 15 dias.

O médico veterinário foi chamado até a propriedade para realizar exame ginecológico. Durante o exame, foi observado que a égua estava prenhe, com uma gestação de aproximadamente 10 meses. Esta prenhez foi resultado de uma monta natural anterior, segundo o proprietário, no entanto a fêmea não foi avaliada posteriormente para confirmar a gestação e os proprietários presumiram que a fêmea não ficou prenhe.

Os proprietários foram orientados a acompanhar a gestação e o parto. Após o parto (Figura 1), foi decidido pelo proprietário o uso do cio do potro para IA, com isso, foi realizado novo exame ginecológico onde observou-se que o útero apresentava uma massa consistente e volumosa em seu interior. A ultrassonografia transretal possibilitou observar no corno uterino esquerdo, uma estrutura anecóica de contorno circular, contendo em seu interior diversas áreas hiperecóicas (Figura 2). Ao exame físico da égua, não foram observadas alterações clínicas, as mucosas estavam normocoradas, temperatura normal, TPC normal e sem secreção vaginal.

Devido ao achado ultrassonográfico, o diagnóstico sugestivo foi de mumificação fetal de uma gestação gemelar.

Figura 1 – Égua com potro recém-nascido e apresentando feto mumificado no útero.



Figura 2 – Imagem ultrassonográfica do útero da égua com feto mumificado em seu interior.



Como protocolo inicial, realizou-se indução do aborto com prostaglandina e tentativa de extração manual do feto, contudo o animal não expulsou e não se obteve êxito na retirada manual. Sendo assim foi indicado retirar o feto mumificado por meio da cesariana após desmame do potro, uma vez que a égua não apresentou alterações clínicas.

Discussão

O histórico reprodutivo fornecido pelos proprietários não era detalhado e não havia manejo reprodutivo controlado, uma vez que inicialmente o veterinário foi chamado para realizar exame ginecológico com objetivo desta ser usada para reprodução, contudo a égua foi diagnosticada com prenhez de 10 meses. Considerando o estágio avançado da gestação e o feto mumificado, fica claro a importância de diagnóstico de prenhez e acompanhamento gestacional. Segundo Crabtree (2018), a gestação equina pode ser diagnosticada por meio da ultrassonografia de 10 a 12 dias após a ovulação, e é evidenciada por um pequeno saco cheio de líquido conhecido como vesícula embrionária, sendo detectada de maneira ideal entre o 14º e 16º dia de prenhez. A não realização



de um diagnóstico de prenhez precoce ou a falha em detectar gêmeos coloca a gravidez em risco (MOREIRA *et al.*, 2021).

Segundo Zachary (2016), a etiologia definitiva da mumificação em éguas é a gestação gemelar, e o feto mumificado e o sobrevivente são abortados juntos, entretanto Moreira *et al.* (2021) afirma que em raras situações um dos fetos pode mumificar e a gestação continuará o com o segundo feto. O feto mumificado pode permanecer na cavidade uterina devido à persistência do corpo lúteo, ou à existência de outro feto vivo. Mesmo com a liberação da placenta, existe a possibilidade de haver uma múmia presa entre o córion e o útero, sendo assim, fica evidente a importância da avaliação ginecológica para fornecer um diagnóstico mais preciso (PIZZIGATTI *et al.*, 2012).

Para a retirada do feto mumificado, foi preconizada a utilização de prostaglandina para promover a expulsão do feto e posteriormente a remoção manual, através da dilatação, conforme Samper *et al.* (2007). Contudo não obteve sucesso, assim, optou-se pela remoção cirúrgica do feto mumificado (opção quando o tratamento farmacológico falha) (SCHIOCHET *et al.*, 2007) após desmame do potro.

Conclusão

A mumificação fetal em equinos está relacionada na maioria das vezes com gestação gemelar, sendo necessário para evitar, realizar o diagnóstico precoce de prenhez e acompanhamento para detectar esses possíveis casos. A ultrassonografia transretal auxilia no diagnóstico de prenhez, gestação gemelar e mumificação fetal, sendo assim extremamente necessária para o acompanhamento reprodutivo da fêmea. A remoção cirúrgica do feto mumificado da cavidade abdominal geralmente apresenta prognóstico favorável.

Referências

- BRAGA, Paula de Oliveira; BARROSO, Rogério Magno do Vale. **Aspectos fisiopatológicos da mumificação fetal**. *Pubvet*, v. 8, p. 1822-1939, 2014.
- CRABTREE, James R. **Management of twins in horses**. *In Practice*, v. 40, n. 2, p. 66-74, 2018.
- LEFEBVRE, Réjean C. et al. **Retrospective case study of fetal mummification in cows that did not respond to prostaglandin F2 α treatment**. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 50, n. 1, p. 71, 2009.



MOREIRA¹, Heldeane Feitosa; DOS SANTOS, Istéfani Garcia; SCANTAMBURLO, Daniela. **RISCOS E INTERVENÇÕES NA GESTAÇÃO GEMELAR EQUINA**. JORNAL Med Vet Science FCAA, p. 34-38. 2021.

MOREIRA, Cristina Saraiva. **Reprodução Animal-Manejo e Clínica Reprodutiva na Coudelaria de Alter**. 2015.

MOYA-ARAUJO, Carla Fredrichsen et al. **Mumificação fetal em vacas Nelore-Relato de caso**. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, v. 38, n. 3, p. 235-237, 2016.

THRELFALL, W. R. , Singleton mummified fetus in a Standardbred mare. **Equine Veterinary Education** , Ohio, v. 17, n. 5, p. 235-239, 2005.

PIZZIGATTI, Dietrich et al. Haematic mummification in a mare with twin pregnancy. **Journal of Equine Veterinary Science**, Ohio, v. 32, n. 5, p. 305-308, 2012.

SAMPER Juan C. PYCOCK Jonathan F. MCKINNON Angus O. **Current Therapy In Equine Reproduction**. Elsevier, 2007.

SCHIOCHET, F. et al. **Ovariohisterectomia laparoscópica em uma gata com fetos mumificados-relato de caso**. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 102, p. 361-364, 2007.

ZACHARY, James F. **Bases da patologia em veterinária** - 6. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2018. 1172p.



MUMIFICAÇÃO FETAL EM OVELHA: RELATO DE CASO

FETAL MUMMIFICATION IN EWE: CASE REPORT

Francisco Welbste Rodrigues COSTA^{1*}; José Janieliano Sousa MOTA²; Antonio Renilson Sousa VIEIRA²; Carlos Henrique Sousa de MELO³; Celso Henrique Souza Costa BARROS³; Livia Correia MAGALHÃES³; Wilder Hernando Ortiz VEGA³

¹Discente do Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário INTA (UNINTA). Sobral, CE. Brasil.

²Médico veterinário do Hospital Veterinário de Grandes animais do UNINTA. Sobral, CE. Brasil.

³Professor(a) do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário INTA (UNINTA). Sobral, CE. Brasil.

*E-mail: welbste Rodrigues@gmail.com

Abstract

Fetal mummification is one of the causes of fetal loss in mammals, with a more significant number of swine cases than cases reported in other species. It is considered a pathology of low prevalence, which may explain the scarcity of information about it. This work aims to report a case of fetal mummification in a sheep in the northern region of the state of Ceará based on the clinical description and diagnostic tools used. A Santa Inês and Dorper crossbred adult sheep was referred for evaluation at the INTA Veterinary Hospital for Large Animals (UNINTA - Sobral), CE, due to symptoms including weight loss, inappetence, respiratory problems, and nasal edema. Anemia, inspiratory dyspnea with bilateral serosanguinous secretion, and enlarged regional lymph nodes were discovered during a clinical examination. A non-floating mass with a rigid consistency adherent to the animal's umbilical and inguinal regions in the abdomen was identified. A radiographic examination of the abdomen revealed the presence of a fetus in the ventral abdomen, circumscribed to the area without fluids. In addition, the abdominal ultrasound showed no heartbeat, fetal movements, or placental membranes in the uterus. Complementary cytology, histopathology, and necropsy exams confirmed the diagnosis of fetal mummification. Histopathology and cytology of nasal lesions and regional lymph nodes revealed *Pythium insidiosum* infection in these tissues. Fetal mummification in this animal may have occurred concomitantly with Rhinofacial Pythiosis. Clinical evaluation by abdominal palpation, ultrasound, and radiographic examination can be used as diagnostic tools in cases of fetal mummification in sheep.

Keywords: fetal death, Ovis Aries, reproductive pathology.

Introdução

O maior rebanho ovino do Brasil se concentra na região Nordeste, com aproximadamente 65% do rebanho nacional. Esta cultura conta com um grande potencial produtivo para carne, mas também contribui com matéria prima natural a partir da pele ou couro (IBGE, 2018). Apesar do potencial, os indicadores produtivos do setor ovino regional e nacional não se comparam a padrões internacionais, em parte, devido a ineficiência em aspectos básicos como o manejo nutricional, sanitário e de bem-estar animal. Porém, é o aspecto reprodutivo o que afeta principalmente a eficiência produtiva do setor (SIMPLICIO; AZEVEDO, 2014).



Diversas patologias que ocasionam falhas tanto na prenhez como no período de gestação do rebanho são reconhecidas regionalmente. Algumas doenças como a brucelose, que pode ocasionar aborto das fêmeas e infertilidade dos machos (DADAR; ALAMIAN, 2021) e a cetose, ou toxemia da prenhez, que afeta fêmeas gestantes (CODEVASF, 2011) são causas comuns da baixa eficiência reprodutiva. A mumificação fetal por sua vez, se apresenta como uma das patologias da reprodução ovina e com poucos casos relatados. Se dá pela reabsorção incompleta do feto após a morte do mesmo, que pode ocorrer por razões multifatoriais. Para que essa patologia ocorra, é necessário a ausência de microrganismos que são responsáveis pela lise dos tecidos mortos (BRAGA, 2014).

Casos de mumificação fetal podem ocorrer de forma secundária em quadros clínicos em que o animal apresenta patologias como toxoplasmose e infecção por língua azul em ovinos (DANIEL GIVENS; MARLEY, 2008). O diagnóstico dessa patologia em grandes animais como bovino e equino se dá por meio de palpação transretal e com o auxílio de exame ultrassonográfico, onde poderá ser identificado como uma massa rígida e imóvel, e sem a presença de líquido placentário (BRAGA, 2014). O presente resumo tem como **objetivo** relatar um caso de mumificação fetal em uma ovelha da região Norte do estado do Ceará, a partir da descrição clínica e ferramentas diagnósticas utilizadas.

Descrição do caso

Identificação do animal e anamnese: No dia 23/06/2021 chegou ao Hospital Veterinário de Grandes Animais do Centro Universitário INTA (UNINTA) um animal da espécie ovina, fêmea de sete anos de idade (Figura 1-A), de uma propriedade localizada no município de Sobral 3°41'10" de latitude sul e 40°20'59" de longitude norte, clima tropical, situada na Mesorregião do Noroeste Cearense. Foi remetida por apresentar histórico de aumento de volume na região nasal no lado esquerdo, com drenagem de conteúdo serossanguinolento, e com respiração ruidosa. De acordo com o relato do tratador, o animal vinha apresentando dificuldade respiratória junto com secreção nasal há 20 dias, dificuldade na alimentação por conta do problema nasal apresentado, e devido a isso, perda de peso.

Procedimentos clínicos: Ao dar entrada ao hospital, foi realizada a avaliação clínica do animal, apresentando frequência cardíaca 100 batimentos por minuto, frequência respiratória de 30 movimentos por minuto, temperatura média de 37.9°C e um escore corporal de 1,5 em uma escala de 1 até 5. Também ausência de movimentos ruminais. Foi observado secreção nasal



serossanguinolenta em quantidade moderada junto a um aumento de volume na região do vestibulo nasal, o que ocasionou dispneia bilateral. Mucosa conjuntival hipocorada. Na palpação abdominal foi detectada consistência rígida da região abdominal ventral desde a região epigástrica até a região inguinal. Não foi perceptível flutuação fetal.

Exames diagnósticos: O hemograma se caracterizou por anemia severa com diminuição na contagem global de hemácias, no teor de hemoglobina, no hematócrito e no volume corpuscular médio (VCM), além de leucocitose caracterizada por linfocitose absoluta. Frente à evidência clínica de aumento de volume na região facial, foi solicitado um exame citológico da área, revelando numerosos macrófagos e células gigantes multinucleadas, além de discreta quantidade de neutrófilos, entremeados por hifas fúngicas septadas de tamanhos irregulares. Devido à rigidez reconhecida na palpação abdominal, foi realizado exame ultrassonográfico, e radiográfico. O Primeiro revelou ausência de líquidos fetais ou batimentos cardíacos, mas presença de uma massa hiperecogênica não distinguível de tecidos na região abdominal ventral incluindo as regiões umbilical e inguinal. A radiografia revelou aumento anormal de radiopacidade das estruturas ósseas com o esqueleto apresentando aspecto compactado, comprimido e excessiva curvatura da coluna vertebral, corroborando com a suspeita de mumificação fetal (Figura 1-B).

Tratamento e evolução: Foi iniciado tratamento de suporte devido ao estado geral e à dificuldade respiratória. Iniciou-se com fluidoterapia e nebulizações com solução salina fisiológica (0,9% de NaCl) e bromexina duas vezes por dia (ALIV V®, Agener União) a dosagem de 1mL em solução fisiológica para nebulização. Adicionalmente, a ovelha foi vermifugada com cloridrato de Levamisol à 5% (Ripercol® L, Zoetis) a dosagem de 5mg/kgpv via oral. Também foi administrada vitamina ADE por via intramuscular (VIT ADE®, CALBOS) segundo dosagem sugerida no produto. No terceiro dia de internação, a ovelha apresentou recaída súbita com decúbito e piora dos parâmetros fisiológicos optando-se pela eutanásia como opção terapêutica. No exame de necropsia, na região abdominal ventral se encontrou aderência acentuada da musculatura abdominal interna ao útero gravídico, na região de inserção do ligamento largo do útero, no mesovário especificamente (Figura 1-C). Parte do corno uterino contendo o feto também se encontrava aderida. Retirada a aderência, verificou-se torção uterina na região da cérvix com aproximadamente 5 giros sobre o eixo do órgão (Figura 1-D). Com a abertura do útero verificou-se a presença de um único feto mumificado (Figura 1-E), sem líquido amniótico, com membranas fetais reabsorvidas, coberto de exsudato esverdeado e apresentando pelo e cascos formados (Figura

1-F). Amostras para exame histopatológico da massa nasal e linfonodos revelaram a presença de hifas fúngicas largas, pouco ramificadas e com dilatação balonosa, marcadas positivamente pela coloração de Metenamina Prata de Grocott. Foi considerado este resultado positivo para *Pythium Insidiosum*, confirmando como doença preexistente a Pitiose rinofacial ovina.

Figura 1 - Descrição gráfica do caso de mumificação fetal em ovelha. **A.** Ovelha apresentando aumento volume região nasal. **B.** Radiografia abdominal em projeção laterolateral com presença de feto mumificado na região ventral do abdômen (seta branca). **C.** Setas amarelas indicando aderência da musculatura abdominal e região do Mesovário. **D.** Seta azul indicando ponto de torção na cérvix uterina. **E.** Feto mumificado. **F.** Feto mumificado sem membranas placentárias, com pelo e cascos formados.



Discussão

Este resumo apresenta procedimentos clínicos e diagnósticos da mumificação fetal em ovinos, com destaque no uso da radiografia abdominal. Destacamos a presença da mumificação em concomitância à doença micótica preexistente no animal, caso não antes reportado na literatura científica.

A mumificação fetal ocorre com maior frequência em espécies politocicas como suínos. Em ovinos, agentes bacterianos, parasitários e virais têm sido reportados como causadores de mumificação, com destaque para vírus da Língua Azul, as bactérias *Chlamydophila abortus* e *Coxiella* e o parasita *Toxoplasma gondii* (DANIEL GIVENS; MARLEY, 2008; LEFEBVRE, 2015). Destacamos a confirmação de um agente micótico, o *Pythium Insidiosum*, causador da Pitiose rinofacial ovina, como agente concomitante à mumificação relatada, porém não foram realizados estudos diretamente do feto mumificado a fim de identificar possíveis patógenos. Relatos em cabras



destacam a presença da mumificação em parto gemelar, sem que esta afete a vida da fêmea (KUMAR *et al.*, 2020). Neste relato, foi iniciada terapêutica de suporte, mas o animal apresentava sintomatologia respiratória severa, produto da obstrução da cavidade nasal derivada da Pitiose Rinofacial. Este fato determinou a condição geral do animal e a pouca resposta ao tratamento instaurado. Kumar *et al.*, (2020) relataram o término gestacional normal em uma cabra com gestação gemelar, onde um dos fetos se encontrava mumificado. Neste caso, o tratamento após remoção da múmia incluiu antibióticos, corticóides, antiinflamatórios não esteroidais e antimicrobianos.

A múmia deste relato encontrou-se do tipo papiráceo, não hemorrágico, com ausência de cor enegrecida, dessecado, murcho, não putrefato, de cor esverdeada e envolvido em uma massa seca de pele e ossos. Este achado se explica a partir da desidratação dos tecidos, pois quando o teor de água do tecido cai abaixo de um limiar crítico, a putrefação bacteriana é inibida. Devido à baixa concentração de oxigênio, as bactérias não podem sobreviver e o corpo não se decompõe (LEFEBVRE, 2015). Acreditamos que a torção uterina contribuiu neste quesito pois levaria à clara redução da oxigenação uterina. Não foram relatados outros casos semelhantes na propriedade, o que confirma a baixa prevalência da mumificação fetal em ovinos. Devido à ausência de escrituração zootécnica não foi possível verificar o tempo de retenção fetal.

Conclusão

A mumificação fetal é uma patologia pouco relatada em ovinos. O exame clínico através da palpação abdominal acompanhado do exame radiográfico da mesma região corporal são ferramentas diagnósticas adequadas na correta identificação da mumificação fetal em ovelhas. Outras doenças preexistentes ou concomitantes podem estar envolvidas na apresentação da mumificação em ovelhas.

Referências

BRAGA, P. De O. Aspectos fisiopatológicos da mumificação fetal. **Pubvet**, 2014. v. 8, n. 15. CODEVASF. **Manual de Criação de Caprinos e Ovinos**. 1-edição ed. Brasília, DF: Codevasf, 2011.

DADAR, M.; ALAMIAN, S. Investigation of small ruminant brucellosis among smallholder farms: The missing link in control programmes of endemic areas. **Zoonoses Public Health**, 2021. v. 68, p. 376–383. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/zph.12796>>.



DANIEL GIVENS, M.; MARLEY, M. S. D. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. **Theriogenology**, 2008. v. 70, n. 3, p. 270–285.

IBGE- BRAZILIAN INSTITUTE OF GEOGRAPHY AND STATISTICS. **Agricultural Census 2017- Preliminary results**. 9. ed. Rio de Janeiro, Brazil: IBGE, 2018.

KUMAR, Sudhir et al. Therapeutic management of a fetal mummification in non-descript pluriparous goat. **IJLAS**, 2020. v. 2, n. 1, p. 8–12.

LEFEBVRE, R. Fetal mummification in the major domestic species: current perspectives on causes and management. **Veterinary Medicine: Research and Reports**, 2015. v. 6, p. 233–244.

SIMPLICIO, A. A.; AZEVEDO, H.C. Manejo reprodutivo: Foco na taxa de reprodução. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2014. v. 8, p. 320–331.



PARTO DISTÓCICO ASSOCIADO A RUPTURA UTERINA E MORTE FETAL EM CADELA - RELATO DE CASO

DYSTOCIC LABOR ASSOCIATED WITH UTERINE RUPTURE AND FETAL DEATH IN A DOG - CASE REPORT

Ilgner Aimar Bezerra PINHEIRO¹; Daiane Michele FRANTZ²; Flávia Augusta de OLIVEIRA²; Leonardo Vaz BURNS²; Rafael de Oliveira RIGAMONTI³; Beatriz Alves Torres GOMES²; Pedro Lucas Góis de Oliveira MINUCI¹

¹Liga Acadêmica Veterinária de Patologia, Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína-TO.

²Clínica Veterinária Universitária, Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína-TO.

³Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araguaína, Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína-TO.

Abstract

The occurrence of reproductive emergencies, such as dystocic deliveries, in the small animal clinic can be commonly found, and may be associated with maternal or fetal changes. The case reported here shows a scenario where, at the University Veterinary Clinic of the Universidade Federal do Norte do Tocantins, there was a need for surgical intervention in a case of dystocic delivery that was associated with uterine rupture, something that is relatively common when oxytocin is administered as an attempt to induce uterine contractions, in an attempt to aid in the expulsion of the fetus. In the case presented here, a 5-year-old female dog arrived at the clinic on an emergency basis, presenting with dystocic delivery and, when performing the surgical procedure, it was possible to observe uterine rupture and fetal death. This is one of the cases that occur due to the lack of adequate information regarding the benefits of elective castration, detailed gestational monitoring and delivery accompanied by professionals. In the scenario shown here, it was possible to observe the importance of adequate facilities and professionals prepared and equipped to act in such scenarios. Furthermore, this is a case that could easily be avoided through a social diffusion of knowledge about conscious animal reproduction.

Keywords: dystocic delivery, uterine rupture, caesarean section.

Introdução

Dentre as urgências reprodutivas em pequenos animais, observa-se a ocorrência de partos distócicos e rupturas uterinas como alguns dos principais exemplos, sendo que, no caso das distocias, elas possuem maior ocorrência em cadelas de porte pequeno em relação as cadelas de porte grande (MÜNNICH; KÜCHENMEISTER, 2009, 2014).

Sua ocorrência é comumente observada em cadelas, e alguns dos fatores que contribuem para tal acontecimento envolve fatores maternos, como a inércia uterina primária ou secundária, sendo a primária a principal causa de distocias que ocorre devido a fadiga ou defeitos na contratação



do miométrio (JOHNSTON *et al.*, 2001), que por sua vez, faz com que não ocorra a expulsão de todos os fetos. Além disso, existem também os fatores fetais, como o gigantismo fetal, que resulta em uma obstrução do canal do parto. É possível também que ocorra uma associação entre fatores maternos e fetais.

Outros fatores como ninhadas numerosas, morte fetal, obesidade materna, estresse materno, ruptura uterina, defeitos no desenvolvimento fetal, torção uterina e tamanho inadequado da pelve também podem resultar em partos distócicos.

A ruptura uterina, por sua vez, é uma ocorrência pouco frequente. Porém, ela pode ocorrer como consequência da administração de ocitocina durante o manejo de um parto distócico (SAMPAIO *et al.*, 2002), determinando exacerbação das contrações uterinas durante o trabalho de parto.

Como forma de tratamento imediato, no caso dos partos distócicos, como fatores causais fetais, com tamanho ligeiramente maior que o normal, realizar a lubrificação do canal do parto e realizar a tração manual do feto, e, se a causa for a ausência de contração uterina, é possível recorrer a medicamentos, como a ocitocina. Porém, se a causa do parto distócico for obstrução é possível recorrer a episiotomia, em casos em que se tem uma vulva pequena ou há um feto com cabeça grande, ou à cesariana, quando a correção da estática fetal não é possível, medicamentos ou não resultam em contrações uterinas eficientes, há desproporção fetopélvica e há sofrimento fetal (LUZ *et al.*, 2015).

Objetivo

O objetivo do trabalho aqui apresentado é relatar a ocorrência de um parto distócico associado a ruptura uterina e morte fetal.

Descrição do caso

Foi recebida uma cadela, da raça Shih-Tzu, de 5 anos, que foi atendida na Clínica Veterinária Universitária da Universidade Federal do Norte do Tocantins. A tutora relatou que o animal havia fugido há cerca de 40 dias, que havia a possibilidade dela ter cruzado e que ela não havia administrado anticoncepcionais. A tutora também relatou que o animal aparentava um aumento abdominal e das mamas, não apresentava diarreias ou vômitos, ingeria água e alimentos em uma frequência normal e com urina em aspecto, volume e frequência normais. O animal



possuía vacinas e desverminação desatualizadas e, no exame físico, ao se realizar a palpação abdominal, se observou uma distensão abdominal e aumento do volume das mamas.

A partir daí, com a suspeita de gestação, 7 dias depois, foi solicitado ultrassonografia abdominal, onde de acordo com a quantidade de líquido intrauterino, calcificações, estruturas fetais, se observou uma prenhez de, aproximadamente, 51 dias, com a presença de 4 fetos. Os fetos possuíam, em média, diâmetro biparietal de 2,7 cm e batimentos cardíacos de 250 Bpm. Eles evidenciaram movimentos intestinais, dilatação de pelve renal, diferenciação de tórax e abdômen e presença de calcificação.

Posteriormente, após 7 dias, a cadela foi novamente levada a CVU em caráter de emergência. A tutora relatou que o animal havia entrado em trabalho de parto e que havia conseguido dar à luz um dos filhotes. Porém, o segundo feto ficou retido no canal do parto, e como medida para auxiliar o parto, a tutora administrou, por conta própria, ocitocina. Em seguida, a tutora conseguiu, através de tração manual, retirar o feto que estava retido, porém morto. Ao observar que os outros 2 fetos não eram expulsos, a tutora levou a cadela para o atendimento clínico. O animal foi encaminhado à cirurgia de emergência, sendo previamente solicitados hemograma e dosagens de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia e creatinina. Os exames demonstraram anemia normocítica normocrômica, hematócrito de 30%, trombocitopenia e discreta leucocitose com desvio à esquerda regenerativa e monocitopenia.

Foi realizada uma incisão pré-retro-umbilical de cerca de 10 cm com bisturi nº 22 com posterior difusão do subcutâneo com tesoura Metzenbaum. Imediatamente emergiu um líquido de cor amarronzada, demandando uso de sucção. Após a drenagem de boa parte do líquido, verificou-se a presença de um feto livre na cavidade abdominal, que foi removido (Figura 1.1). Realizou-se a inspeção do útero, sendo identificado um ponto de ruptura completa (Figura 1.2) e vários locais com ruptura incompleta e fissuras (Figura 1.3). Foi removido, ainda, mais um feto sem vida. Procedeu-se com a ligadura dupla do pedículo ovariano, pinçando acima da ligadura com pinças Kelly e posterior secção entre as pinças. Em seguida fez-se a ligadura e secção do ligamento largo do útero com tesouras Mayo. O mesmo procedimento foi realizado para o ovário, corno uterino e ligamento direto. Com uma compressa isolou-se o corpo uterino e realizou-se ligadura dupla (sendo uma transfixante), secção e sutura de coto. Verificou-se se havia presença de focos de hemorragia e procedeu-se então com a lavagem da cavidade abdominal com solução fisiológica aquecida e retirada dos restos fetais aderidos, e posterior sutura da musculatura, subcutâneo e pele.

Figura 1 - Procedimento cirúrgico em distocia com ruptura uterina. 1.1. Retirada de feto da cavidade abdominal. 1.2. Ruptura uterina completa, com exposição do feto. 1.3. Útero com pontos de ruptura incompleta e fissuras.



Ao fim do procedimento, prescreveu-se dipirona 500 mg/ml 5 gotas/VO/Bid/5 dias, meloxicam 0,5 mg 1 comprimido/VO/Sid/5 dias, Synulox® 50 mg 1 + 1/2 comprimido/Vo/Bid/10 dias e metronidazol 40 mg/ml 2,89 ml/VO/Sid/7 dias. Além disso, solicitou-se a limpeza do local da sutura com solução fisiológica e pomada Vetaglós® durante 10 dias. Posteriormente, no retorno para retirada dos pontos, observou-se que a cadela e o filhote apresentaram evolução satisfatória.

Discussão

Esse caso torna evidente a necessidade de um manejo de reprodução correto e um acompanhamento gestacional minucioso, acompanhado de um parto adequado, pois, é possível observar que, o acesso a rua, a ausência de castração eletiva e a realização de um parto desacompanhado de profissionais possibilitou que a cruzada, o parto distócico e, posteriormente, a ruptura uterina ocorressem.

Baseado nesses fatores, é possível que emergências reprodutivas como essas sejam evitadas através de uma difusão social de conhecimento, a respeito da reprodução animal consciente.

Conclusão

Esse trabalho mostra como urgências reprodutivas podem se desenvolver e aponta a importância tanto da prevenção dessas ocorrências, quanto da necessidade de instalações adequadas e profissionais preparados e equipados para agir em tais cenários.



Referências

COSTA, T. I. R.. **Urgências reprodutivas na cadela**. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

JOHNSTON S. D.; KUSTRITZ M. V. R., Olson PNS. Periparturient disorders in the bitch. *In*: Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p.129-145.

LUZ, M. R.; MÜNNICH, A.; VANNUCCHI, C. I. (2015). Novos enfoques na distocia em cadelas. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 39, 354-361.

MÜNNICH, A.; KÜCHENMEISTER, U. Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. **Reprod Domest Anim**, v.49, suppl, p.64-74, 2014.

MÜNNICH, A.; KÜCHENMEISTER, U. Dystocia in numbers - Evidence-based parameters for intervention in the dog: causes for dystocia and treatment recommendations. **Reprod Domest Anim**, v.44, p.141-147, 2009.

SAMPAIO, R. L.; SAMPAIO, R.; LACERDA, M. S. Ruptura de útero em cadelas gestantes após a aplicação de ocitocina: relato de 2 casos. *In*: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet), 19, 2002, Gramado, RS. **Anais[...]** Gramado: Conbravet, 2002. CD-ROOM



PIOMETRA E LEIOMIOSSARCOMA DIFERENCIADO UTERINO EM CADELA: RELATO DE CASO

PYOMETRA AND DIFFERENTIATED UTERINE LEIOMYOSARCOMA IN A FEMALE DOG: CASE REPORT

Beatriz de Oliveira RAMOS^{1*}; Jordana Brites JERONIMO¹; Luis Hiago Coutinho MARQUES²;
Ádila Rosa Corsini SOUZA²; Luan Junio WUTKE²; João Victor de Andrade ALVES¹; Márcia
Rezende FAES³; Isabel Candia Nunes da CUNHA⁴

¹Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro (RJ) - Brasil. beatrizdeo.ramos@gmail.com

²Residente em Reprodução, Obstetrícia e Ultrassonografia de Pequenos Animais na Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

³Médica Veterinária com atuação no Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) na
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

⁴Professora responsável pelo Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) na Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

*Email: beatrizdeo.ramos@gmail.com

Abstract

Pyometra is a uterine disorder, usually caused by the bacterium *Escherichia coli*, by ascension through the genitourinary tract or hematogenous route. The action of progesterone is one of the factors that generates this pathology, due to the changes that occur in the uterus that favor bacterial development. Pyometra can be characterized as open, when there is vaginal secretion, or closed. Uterine neoplasms, also caused by the action of sex hormones, affect middle-aged and elderly female dogs, and are uncommon in female dogs and cats. Surgical removal through OSH is the treatment of choice and the prognosis is generally favorable.

Keywords: Neoplasm, infection, reproduction, canine.

Introdução

A piometra é um distúrbio uterino mediado por progesterona (NELSON; COUTO, 2006), uma condição séptica inflamatória causada pela bactéria *Escherichia coli*. A progesterona, seja ela endógena ou exógena, leva à proliferação endometrial, sua secreção glandular, e suprime a atividade do endométrio, evitando expulsão e favorecendo o acúmulo de secreção, um meio propício para o desenvolvimento de bactérias (FELDMAN; NELSON, 1996).

A piometra pode ser aberta ou fechada. A piometra aberta se diferencia da fechada pela passagem do conteúdo uterino pela cérvix aberta, gerando uma secreção vaginal, ao passo que na fechada não há secreção vaginal pelo fechamento da cérvix, e o animal apresenta um quadro clínico que tem como característica a distensão abdominal (COUTO; NELSON, 1998).



Via hematogena ou ascensão através do trato genito-urinário são as formas de contaminação bacteriana do útero, sendo que a infecção por via sanguínea é a menos comum (NELSON; COUTO, 2006). Os sinais clínicos da patologia incluem corrimento vaginal, letargia, perda de peso, prostração e poliúria (NELSON; COUTO, 2006).

As neoplasias uterinas ocorrem em animais de meia-idade e idosos, pouco frequente em pequenos animais (FOSSUM, 2014). São causados pela ação dos hormônios sexuais (SOUZA *et al.*, 2012), e o leiomiossarcoma é um dos mais frequentes (MACLACHLAN; KENNEDY, 2002).

Como forma de diagnóstico, a ultrassonografia e radiografia são indicadas. (FELDMAN; NELSON, 1996). A ultrassonografia fornece informações adicionais, como a posição uterina, espessura da parede do mesmo e tamanho do lúmen, além de sugerir o conteúdo (NELSON; COUTO, 2006).

A ovariosalpingohisterectomia (OSH) é o tratamento de eleição para a piometra (FRANSSON; RANGLE, 2003), porém, a variar do quadro clínico e do interesse do proprietário, como em casos de reprodutoras (NELSON; COUTO, 2006).

Objetivo

O objetivo do presente trabalho é relatar um caso de piometra fechada e tumor uterino leiomiossarcoma diferenciado, em uma cadela idosa de 10 anos de idade, diagnosticada através da ultrassonografia abdominal e histopatologia, respectivamente.

Descrição do Caso

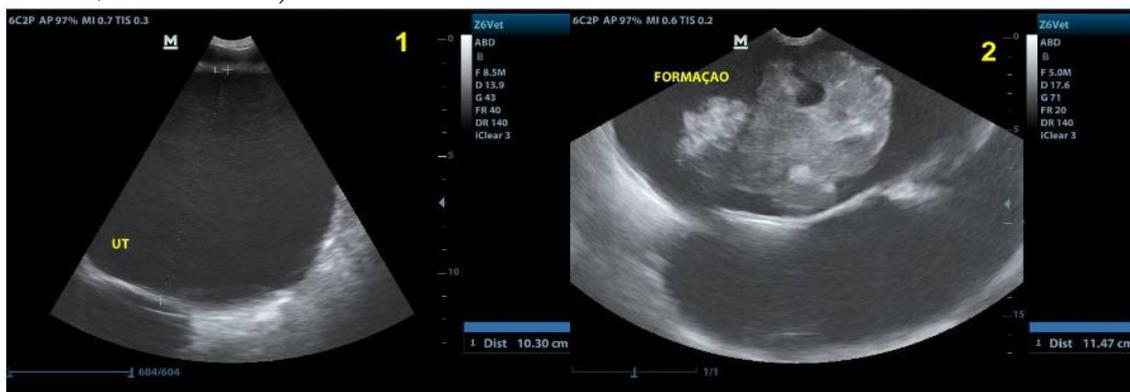
Foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HVET/UENF) na cidade de Campos dos Goytacazes, um canino fêmea, SRD, de cerca de 10 anos de idade, não castrada, com acesso à rua e não vacinada.

O tutor relatou aumento abdominal há 2 semanas, com cio recente há cerca de 2 meses. Na anamnese foi relatado oligodipsia, fezes escurecidas e intensa prostração recente. Ao exame físico, foram avaliadas as glândulas mamárias e os linfonodos, e foram encontrados nódulos mamários em ambas as cadeias, mas não foi possível mensurar o seu tamanho devido ao elevado grau de distensão abdominal.

Na ultrassonografia abdominal, foi identificado útero com aumento de diâmetro em sua luz, medindo cerca de 10,3 cm, com conteúdo anecogênico, sugestivo de piometra, hemometra ou

mucometra (Figura 1). Além disso, uma massa hiperecogênica de tamanho 11,47 cm localizada próxima ao pedículo direito, envolta por conteúdo anecogênico (Figura 2).

Figura 1 e 2 - Imagens ultrassonográficas. 1) Útero apresentando, em seu lúmen, conteúdo anecogênico, medindo em sua maior extremidade 10,30 cm, sugestivo de piometra, hemometra ou mucometra. 2) Massa hiperecogênica localizada no lúmen uterino, envolta por líquido anecogênico. (Fonte: Arquivo Pessoal NuARC/HVET-UENF).



Foram solicitados exames complementares, hemograma completo e bioquímico. Os resultados indicaram anemia normocítica normocrômica, leucocitose neutrofílica com desvio nuclear dos neutrófilos para a esquerda (DNNE) leve, aumento das taxas de ALT, GGT, proteína total e globulina.

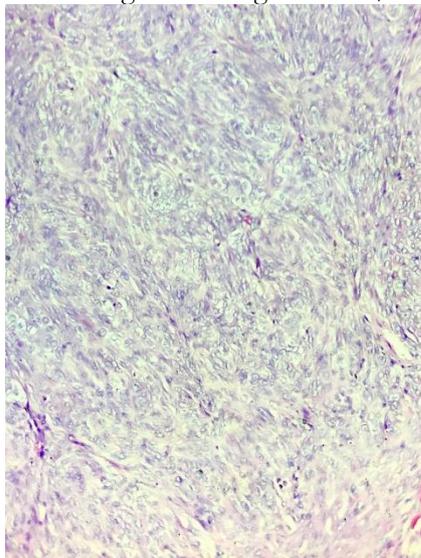
O animal foi encaminhado para a ovariectomia no setor de Cirurgia de Pequenos Animais do HVET-UENF, pois somente a terapia clínica não seria viável para o caso. Após a esterilização terapêutica, foi encontrada uma massa envolta de líquido purulento, posteriormente encaminhada para exame histopatológico, e com diagnóstico de leiomiossarcoma diferenciado (Figura 3).

Discussão

O caso relatado trata-se de uma cadela SRD, fato que corrobora com os achados de Johnston *et al.* (2001), os quais relataram em seu trabalho que os animais SRD eram mais afetados. O peso não tem correlação com a patologia (JOHNSTON *et al.*, 2001).



Figura 3 - Exame microscópico de massa em lúmen uterino, com diagnóstico de leiomiossarcoma diferenciado (Fonte: Laboratório de Morfologia e Patologia Animal/HVET-UENF).



A piometra acomete fêmeas de todas as idades, com maior frequência em animais de meia-idade, no período do diestro (FOSSUM, 2014). Evangelista *et al.* (2010) apresentaram a média de idade de 7 anos para a maior incidência de casos, animais já considerados senis, assim como a paciente do presente relato, de 10 anos. Além disso, tais valores confirmam a síndrome da piometra da cadela idosa citada por Feldman e Nelson (1996), na qual a doença resulta das excessivas exposições do útero à progesterona durante as fases de diestro do ciclo estral.

O diagnóstico foi realizado por meio da ultrassonografia que é, de acordo com Alvarenga *et al.* (1995), o método considerado eficiente para a confirmação da patologia. A imagem ultrassonográfica é de uma estrutura tubular bem definida, conteúdo luminal uterino de menor ecogenicidade que a parede (ALVARENGA *et al.*, 1995), de forma compatível aos achados ultrassonográficos encontrados no paciente.

Evangelista *et al.* (2010) sugerem que os contraceptivos apresentam íntima relação com afecções no trato reprodutor, como a piometra. A tutora fez uso de progestágeno em sua cadela em todos osaios, com doses indiscriminadas aplicadas por um profissional não graduado em medicina veterinária; assim, reitera o afirmado por Dias *et al.* (2013), que o uso de contraceptivos hormonais corriqueiros pode influenciar na manifestação da doença de forma precoce.

A histopatologia da massa encontrada em lúmen uterino revelou o diagnóstico de leiomiossarcoma diferenciado, uma neoplasia maligna de musculatura lisa de característica infiltrativa (MACLACHLAN; KENNEDY, 2002). Histologicamente, mostra-se com células



excepcionais, de alto índice mitótico, enquanto se apresenta macroscopicamente com áreas de necrose (MACLACHLAN; KENNEDY, 2002).

Conclusão

No presente estudo, verificou-se a melhora da paciente – que apresentava intensa prostração e aumento de volume abdominal – após a OSH, mostrando-se uma forma eficiente de tratamento. A ultrassonografia abdominal foi uma forma satisfatória de diagnóstico, permitindo a localização e visualização das paredes uterinas, bem como presença de conteúdo e massa hiperecogênica, de forma a sugerir piometra e neoplasia uterina.

O uso de contraceptivos hormonais exógenos está relacionado à falta de informação dos tutores, os quais geralmente realizam as aplicações indiscriminadamente, ou seja, em doses incorretas; destarte, têm-se os referidos efeitos colaterais, como piometra e neoplasias de trato reprodutivo. O prognóstico é favorável, desde que seja realizada a retirada completa do tumor e que não haja indícios de metástases.

Referências

COUTO, R. W.; NELSON, C. G. Distúrbios da vagina e do útero. In: _____. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p. 681-684.

DALECK, R.; DE NARDI, B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008, 612p.

FELDMAN, E; NELSON, R. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996.

FOSSUM, T. **Cirurgia de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

FRANSSON B.A. & RAGLE C.A. **Canine Pyometra: an update on pathogenesis and treatment**. Compendium. 25, p. 602-612, 2003.

MACLACHLAN, J. & KENNEDY, C. Tumors of the Genital Systems. In: Meuten, D. J. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing Company, Cap. 11, p. 547-573. 2002.

NELSON R.W. & COUTO C.G. Distúrbios da vagina e útero. In: **Fundamentos da medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. p. 486-87.



POSTIOPLASTIA PARA CORREÇÃO DE ESTENOSE DO ÓSTIO E MUCOSA PREPUICIAL CONGÊNITA EM UM FELINO DE 10 MESES: RELATO DE CASO

POSTIOPLASTY TO CORRECTION CONGENITAL STENOSIS OF THE OSTIUM AND PREPUTIAL MUCOSA IN A 10 MONTH FELINE: CASE REPORT

Thamys COSTA^{1*}; Gleice Mendes XAVIER¹; Rodrigo Freitas BITTENCOURT¹; Lara Mariane Rios BARBOSA¹; Eduardo Oliveira COSTA¹; Mateus Martins Rodrigues dos SANTOS¹; Isabella de Matos Brandão CARNEIRO¹; Mirella da Silva MIRANDA¹

¹Escola de Medicina de Veterinária, Universidade Federal da Bahia Av. Milton Santos, 500. Campus Ondina, Salvador/BA.

*E-mail: thamys.costa@ufba.br

Abstract

In veterinary routine, changes in the penis and foreskin are frequent. However, in the feline clinic the incidence of these changes is rarely reported. These alterations can be defined as acquired or congenital, compromising the patient's reproductive capacity, due to the painful process involved, which negatively interferes with the reproductive capacity of the reproducers. Among the most common penile and preputial disorders in cats we have: balanoposthitis, trauma, priapism, hypospadias, persistence of penile frenulum and phimosis. In general, the signs presented by patients are inability to mount, dysuria, pollakiuria, hematuria, edema and even urethral obstruction. Therefore, this study aimed to report the clinical presentation and surgical correction of a case of ostium and preputial mucosa stenosis in a 10-month-old feline associated with urethral obstruction.

Keywords: anomalies, phimosis, cystitis, cats, trauma.

Introdução

São definidas como alterações congênicas, defeitos em alterações morfológicas funcionais ou em funções identificadas ao nascimento. Essas, podem ocorrer devido a fatores genéticos ou ambientais e em alguns casos, não é possível estabelecer a causa/origem de determinada alteração (CRESPILHO *et al.*, 2006). Dentre as alterações congênicas que acometem os felinos, estão incluídas as alterações do sistema reprodutor desses animais (JOHNSTON; KUSTRITZ, OLSON, 2001). A fimose é resultante de patologia congênita ou adquirida (oriundas de lesões) que promove estenose do óstio prepucial, impossibilitando a exposição do pênis. Os sinais clínicos, são sinais comuns a obstrução urinária como disúria, estrangúria, polaquiúria, hematúria, lambadura excessiva do prepúcio (MAY; HAUPTMAN, 2009; DE VLAMING; WALLACE; ELLISON, 2019; BASTOS *et al.*, 2020). Logo, objetivou-se apresentar um caso de estenose do óstio e mucosa prepucial em um felino de 10 meses associado ao quadro de obstrução uretral.

Descrição do caso

Foi atendido no setor de emergência do Hospital de Medicina veterinária da UFBA, um felino sem raça definida, 4,2kg, com 10 meses de idade, apresentando anúria. O tutor relatou que o paciente vinha passando por diversas mudanças de ambiente e que após estas, esse passou a apresentar hematuria, polaquiúria e quadros de obstruções uretrais anteriores. Ao exame físico geral, verificou-se que os parâmetros fisiológicos estavam dentro da normalidade e no momento do exame, foi possível observar repleção da vesícula urinária. Ao exame do trato genital do paciente verificou-se estenose do óstio prepucial, impossibilitando a exposição manual do pênis (Fig. 1). Devido ao quadro de obstrução e impossibilidade de realizar a sondagem uretral, foi indicado a realização do procedimento cirúrgico de postioplastia precedida de orquiectomia.

Figura 1 - Estenose do óstio uretral em um felino. A e B, Estenose do óstio prepucial demonstrada após tentativa de exposição do pênis.

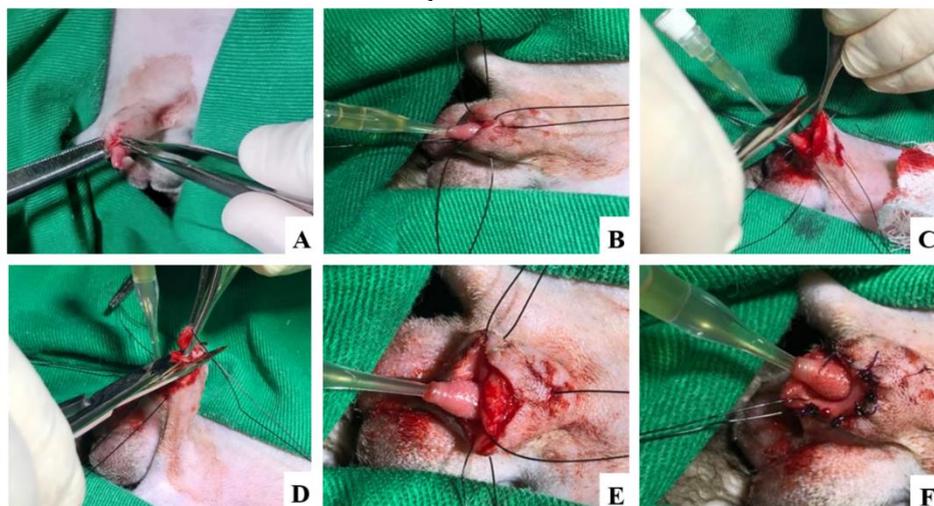


Assim, foram solicitados exames complementares e pré-operatórios. No exame hematológico não observou alterações no eritograma, mas foram encontradas leucocitose por neutrofilia, anisocitose leve e monócitos ativados. Nos exames bioquímicos observou-se hiperalbuminemia, elevações séricas em valores de fosfatase alcalina e na gama glutamiltransferase. Ao exame ultrassonográfico de abdômen total, foi visualizada bexiga urinária com forma, contornos e distensibilidade normais, com presença importante de sedimento. Paredes vesicais espessas, lisas e regulares, achados ultrassonográficos sugestivos de cistite. Demais órgãos abdominais não apresentaram alterações e testículos em topografia normal.

O paciente foi encaminhado para procedimento de postioplastia seguida de orquiectomia. Para a cirurgia, o animal foi posicionado em decúbito dorsal. Após a assepsia da pele e colocação dos panos de campo, a pele foi incisionada em cunha no pólo cranial do óstio prepucial com objetivo de promover abertura para acesso ao pênis. No momento da tentativa de exposição

verificou-se a mucosa prepucial estreita, impedindo total exposição peniano (Fig. 2 A e B). Logo foi realizada incisão seguindo a técnica cirúrgica preconizada por Fossum (2014) com adaptação, onde foi realizada a remoção de uma parte da mucosa e pele prepucial estenosada (Fig. 2 C e D), após remoção da parte estenosada do prepúcio foi possível realizar exposição total do pênis (Fig. 2 E), e passagem da sonda, foi realizada a rafia do prepúcio com padrão de sutura simples separada, utilizando o fio Caprofyl 3-0 (Fig. 2 F). Para o pós-cirúrgico foi prescrito amoxicilina com clavulanato, meloxicam, dipirona, cloridrato de tramadol e prazosina. Associado ao tratamento farmacológico também foram realizadas mudanças no manejo e dieta do animal para auxiliar no tratamento da cistite e obstrução uretral.

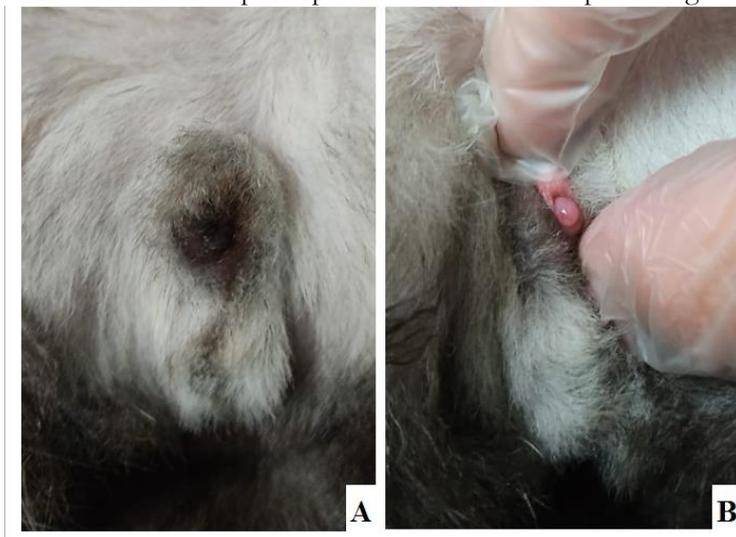
Figura 2 - Felino SRD de 10 meses, macho, decúbito dorsal. Procedimento de postioplastia com orquiectomia.



O paciente retornou seis e dez dias após o procedimento cirúrgico. Após seis dias observou-se durante o exame físico repleção de bexiga e deiscência de pontos por lambedura, também foi realizada a troca da Prazosina pela Amitriptilina e prescrição do Anizen Homeo Pet®, para tratar a cistite idiopática, além de salientar ao tutor a importância do manejo e cuidado pós-cirúrgico para resolução do quadro do paciente. Na urinálise, realizada no dia do retorno observou-se alterações que confirmava o quadro de cistite. Na avaliação de 10 dias após mudança de manejo e reajustes medicamentosos, foi possível observar melhora no quadro de cistite e no resultado da postioplastia, no qual o pênis já encontrava-se totalmente coberto sem dificuldade de expor o órgão e paciente não apresentava dificuldade de micção ou quadro de obstruções.

Dois meses e meio após o procedimento cirúrgico o tutor foi contatado e foi solicitado um novo retorno para avaliação do paciente, durante a anamnese informou que o animal está bem, sem casos de obstrução ou alteração na genitália externa recente, durante o exame físico específico, observou prepúcio sem sinais de estenose ou fibrose e facilidade para expor o pênis (Fig. 3 A e B).

Figura 3 - Resultados da postioplastia 2 meses e meio após cirurgia A e B.



Discussão

Alterações penianas e prepúciais promovem sinais clínicos inespecíficos, muitos deles semelhantes ao de doenças do trato genito-urinário, geralmente as anomalias só são diagnósticas durante o momento do exame físico (HART; PETERSON, 1971; ROCHAT, 2001; ROTA *et al.*, 2008; MAY; HAUPTMAN, 2009; NASCIMENTO; SANTOS, 2011). Corroborando com o presente relato, no qual a anomalia congênita só foi observada no momento do exame físico específico pelo médico veterinário.

Ettinger e Feldman (2008) define a cistite idiopática felina como uma afecção neurogênica que cursa com obstrução, devido a uma inflamação do trato urinário inferior acompanhado de um edema uretral. Sendo assim, deve haver uma mudança de manejo, associado ao tratamento com ansiolíticos, já que a cistite idiopática felina está relacionada à ansiedade e estresse dos animais (NORSWORTHY, 2011). No presente relato, a mudança de manejo, associado ao enriquecimento ambiental e ao tratamento com ansiolíticos, demonstrou-se eficiente para tratar as crises de obstrução uretral recorrente, na qual o paciente vinha apresentando.



Conclusão

O caso descrito reforça a relevância da postioplastia junto a mudança de manejo nutricional e ambiental para resolução definitiva do quadro de estenose do óstio e mucosa prepucial associado ao quadro de cistite idiopática felina restabelecendo a qualidade de vida do animal e quando comparada a penectomia é um procedimento menos invasivo e fácil resolução. Além disso, demonstra a importância do conhecimento acerca da anatomia reprodutiva e das manifestações dessas afecções, devendo fazer parte da rotina clínica veterinária um exame minucioso desses órgãos e anexos, assim como a orientação aos tutores sobre a importância do manejo adequado, como forma preventiva para as afecções adquiridas.

Referências

- BASTOS, M. M. S.; PANTOJA, A. R.; EVERTON, E. B.; CARNEIRO, M. J. C.; AIRES, E. O. M. Postioplastia por circuncisão para redução de fimose em gato: relato de caso. *Medicina Veterinária (UFRPE)*. v.14, n. 2, p.113-116, 2020.
- CRESPILHO, A. M.; MARTINS, M. I.; SOUZA, F. F.; LOPES, M. D.; PAPA, F. O. Abordagem terapêutica do paciente neonato canino e felino. *Revista Brasileira Reprodução Animal*. v. 30, n. ½, p. 3-10, 2006.
- DE VLAMING, A.; WALLACE, M. L.; ELLISON, G. W. Clinical characteristics, classification, and surgical outcome for kittens with phimosis: 8 cases (2009–2017). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 255, n. 9, p. 1039-1046, 2019.
- HART, B. L.; PETERSON, D. M. Penile hair rings in male cats may prevent mating. *Laboratory animal science*, v. 21, n. 3, p. 422, 1971.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. *Canine and feline theriogenology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 592 p.
- MAY, L. R.; HAUPTMAN, J. G. Phimosis in cats: 10 cases (2000–2008). *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 45, n. 6, p. 277-283, 2009.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. *Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 151p.
- ROCHAT, M. C. Priapism: a review. *Theriogenology*, v. 56, n. 5, p. 713-722, 2001.



PRESENÇA DE FETO MUMIFICADO NA CAVIDADE ABDOMINAL DE FELINO: RELATO DE CASO

THE PRESENCE OF MUMMIFIED FETUS IN THE ABDOMINAL CAVITY OF A FELINE: A CASE REPORT

Lana Caroline da Costa CARDOSO^{1*}; Andressa Letícia Rocha BRANCO¹; João Marcelo de Sousa SOARES¹; Yan Luís Brito Matni MONTE¹; Bianca Silva de AGUIAR²; Letícia da Silva RAIOL²; Sebastião Tavares Rolim FILHO³; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO³

¹Acadêmico de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil

²Residente, Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira (HOVET/UFRA), Belém, Pará, Brasil

³Docente, Instituto de Produção e Saúde Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, Brasil.

*e-mail: lana.caroline2025@gmail.com

Abstract

In cat's gestational period, diverse kinds of dystocia can attack the reproductive tract, as fetal mummification, which is related to different species. This process results in a fetal reabsorption caused by the fetal death, although, cases like that in felines are considered rares and the virals agents are the biggest cause of abortion. The reported case is about a 8 years old feline specie, female, with no race defined, weighing 4,6kg, and spayed, which, after taking physical and images exams and a exploratory surgery, were possible to diagnosis and remove the mummified fetus in a topography of the right uterine horn. It abnormal location may compressed the female bladder, making the animal show symptomatology of cystitis. This diagnostic raised suspects about what could possibilitate the income and permanency of the fetus in the peritoneal cavity, where the malpractice of the surgeon in the execution of the ovariohysterectomy showed as the principal hypothesis that resulted in that post-surgical complication.

Keywords: pregnancy, mummified fetus, reproduction, feline.

Introdução

A partir da fisiologia gestacional em gatas, no processo de fertilização, os oócitos continuam nos ovidutos por 3 a 4 dias. Logo após a implantação, o embrião mantém-se na cavidade uterina, nutrindo-se e se desenvolvendo por em média de 63 a 67 dias de gestação final (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001; FELDMAN; NELSON, 1996; SORRIBAS, 1995). No entanto, para Prestes e Alvarenga (2006), podem haver complicações fetais ou complicações no próprio organismo materno, sendo responsável pelas mortes pré-natais difíceis de serem diagnosticadas, podendo ser oriundas de agentes infecciosos ou não infecciosos, ocasionando danos à cadeia produtiva.



A priori, considerando as diversas distocias do trato reprodutivo da fêmea que podem acometê-la durante o período gestacional, o processo de mumificação fetal vem sendo relatado em diversas espécies, no entanto, com menor frequência em felinos. A mumificação é consequência da morte fetal que resulta em reabsorção fetal incompleta. Isso ocorre por um mecanismo inespecífico de desidratação dos tecidos moles nos fetos, que sofrem a deposição de cálcio (BRAGA, 2014). Nas gatas, os agentes virais (como na leucemia felina, peritonite infecciosa felina e rinotraqueíte felina) são os mais importantes e a reabsorção fetal pode ocorrer sem qualquer sinal clínico ou corrimento vaginal (SCHIOCHET, 2007).

Esse tipo de afecção ainda é pouco abordado na rotina clínico-cirúrgico no Brasil, principalmente por se tratar de episódios raros na espécie felina (ZENI *et al.*, 2021). O diagnóstico, normalmente, é confirmado por meio do histórico clínico, exames laboratoriais e exames de imagens. Entretanto, na maioria dos casos, a anamnese, sintomatologia e exames complementares como ultrassonografia e radiografia, não são decisivos para confirmar o diagnóstico, fazendo-se necessário realizar a laparotomia exploratória em caráter de urgência, para se obter um melhor resultado do diagnóstico e resolução do caso (BOLSON *et al.*, 2004).

Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo discorrer e correlacionar as informações a respeito da presença de um feto mumificado na cavidade abdominal com exame clínico e exames complementares.

Descrição do caso

Foi atendido no Hospital Veterinário Mario Dias Teixeira da Universidade Federal Rural da Amazônia (HOVET/UFRA), um animal da espécie felina, sem raça definida (SRD), fêmea, de 8 anos de idade e pesando 4,6 kg. Segundo a anamnese, o animal apresentava urina de coloração amarelada a alaranjada e hiporexia. No exame físico, a gata apresentava temperatura retal 37,5°C, mucosas normocoradas, tempo de preenchimento capilar (TPC) ≤ 2 , ausência de dor à palpação abdominal e sem estruturas palpáveis no útero como suspeita de gestação. Em seguida, o animal foi encaminhado ao setor de diagnóstico por imagem, sendo realizados os exames complementares de ultrassonografia (US) e radiografia abdominal.



Na US, não foi visto nada digno de nota, não sendo possível detectar útero e ovários, no entanto, no exame radiográfico de abdômen foi observado, em topografia de corno uterino direito, estruturas mineralizadas compatíveis com estruturas ósseas, apresentando crânio com sinal de Spalding, membros, costelas e coluna medindo 7,1 cm x 3,0 cm, fazendo com que houvesse deslocamento de alças intestinais para a esquerda. O diagnóstico foi sugestivo de feto macerado, logo, foi solicitada intervenção cirúrgica de laparotomia exploratória para a identificação do achado. Para a realização da laparotomia exploratória, a paciente foi posicionada em decúbito dorsal. Posteriormente foi realizada a antisepsia com clorexidina 2% e álcool 70%. Em seguida, foi feita uma incisão pré-retro-umbilical, com divulsionamento do tecido subcutâneo para acesso a cavidade abdominal através da linha alba com auxílio de bisturi nº 24, possibilitando a identificação das estruturas anatômicas da área. Na região cranial à bexiga, recoberta pelas alças intestinais e omento, observou-se uma estrutura firme e ovóide encapsulada, compatível com a que foi visualizada no exame de raio-x. A retirada da estrutura ocorreu apenas com a manipulação digital, já que ela não se encontrava aderida a nenhuma estrutura intra-abdominal. Ao fim do procedimento cirúrgico, foi realizado o fechamento da cavidade abdominal com padrão de sutura isolado Sultan com fio de nylon 2-0, redução do espaço morto com fio absorvível poliglactina 2-0 e dermorráfia utilizando nylon 3-0 em pontos simples isolados. Por fim, foram dadas as orientações pós cirúrgicas e prescrição medicamentosa, sendo esta última à base de amoxicilina com clavulanato de potássio (30 mg/kg), administrada por via oral a cada 12 horas durante 7 dias, meloxicam (0,1 mg/kg) por via oral a cada 24h durante 4 dias e dipirona (24 mg/kg) por via oral a cada 12 horas durante 3 dias.

Figura 1 – Cirurgia exploratória e retirada do feto mumificado do abdômen.



Figura 2 – Detalhe do feto mumificado: aspecto de múmia, ausência de órgãos moles e líquidos, observa-se estruturas ósseas duras encapsuladas.



Discussão

O animal apresentava parâmetros fisiológicos sem nenhuma alteração e clinicamente bem, exceto pela coloração diferenciada da urina; a respiração e frequência cardíaca normal, com temperatura retal (37,5°C), assim como nenhuma sensibilidade na região abdominal característico de dor. Contradizendo Toniolo e Vicente (2003) que relatam a possível ocorrência de hipertermia associado a infecção, descompensação fisiológica e dores abdominais.

Ao longo da anamnese, a tutora relatou que a gata tinha sido castrada, fato este, confirmado pela ultrassonografia através da ausência de útero e ovários. No entanto, foi realizada uma radiografia abdominal, no qual foi diagnosticado feto mumificado, assim como descrito por Santos (2017), por ser um exame que possibilita buscar e diagnosticar injúrias que podem acometer o paciente.

Na laparotomia exploratória, retirou-se, da cavidade abdominal, uma estrutura ovóide e encapsulada (figura II) de aspecto seco, com presença de estruturas ósseas muito característico de mumificação fetal que condiz com Souza (2012), pois ocorre a deposição de material mineralizado após a morte fetal juntamente à reabsorção de líquido dos tecidos moles. Diferentemente de Zanella *et al.* (2007) que cita o feto mumificado retido no útero, o caso abordado apresentou tal achado presente na cavidade abdominal (figura I) da gata castrada.

Os exames de imagem foram importantes para a confirmação de que a estrutura dura, sem líquido e encapsulada tratava-se de um feto mumificado não aderido a nenhuma porção ou órgão da cavidade intra-abdominal, consoante a Nack (2000), a presença desse feto pode não apresentar sinais clínicos, sendo compatível com a vida, por isso, seu diagnóstico pode não ser precoce. Entretanto, sua topografia anormal, na região do corno uterino direito, próximo à bexiga, pode ter



comprimido e comprometido o sistema urinário e, assim, apresentando sintomatologia de uma possível cistite, através de alterações na coloração da urina.

A presença do feto mumificado na região abdominal pode ter advindo de uma imperícia do cirurgião, mediante a não identificação da passagem da estrutura no útero para a cavidade abdominal durante a ovariectomia anteriormente realizada, o que pode ser caracterizado como uma complicação pós-cirúrgica que, de acordo com Burrow et al. (2005), é passível de acontecer esses problemas em cerca de 20% dos casos dos pacientes que realizam esse procedimento cirúrgico.

Tratando-se de um caso raro, por não ter sido realizado o histopatológico para a identificação de um possível agente causador, dificultando uma conclusão mais assertiva e a ausência de comprovações científicas de que o feto passou para a cavidade extrauterina durante a execução da ovariectomia, a partir de análises e discussões, a hipótese da imperícia médica tornou-se a mais provável, devido a ausência do útero, ovários e das trompas e a presença do feto na região correspondente ao corno uterino.

Conclusão

A laparotomia exploratória permitiu a retirada da estrutura confirmada como feto mumificado. Ademais, com a extração do feto mumificado, a paciente apresentou boa recuperação, conduzindo a correlação de que sua sintomatologia estava associada à presença do feto.

Referências

BOLSON, J.; PACHALY, J. R.; GODOY, C.; ORNES, R.; SCHOSSLER, J. E. Fisometra em cadela (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) - relato de caso. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia**, Umuarama, v. 7, n.2, p. 171-174, 2004.

BRAGA, P. O; BARROSO, R. M. V.; Aspectos Fisiopatológicos da Mumificação Fetal. **Pubvet**, Londrina, v. 8, N. 15, p. 1752, 2014.

BURROW, R.; BATCHELOR, D.; CRIPPS, P. Complications observed during and after ovariectomy of 142 bitches at a veterinary teaching hospital. **Veterinary Record**, v. 157, n. 26, p. 829-833, 2005.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Ovarian cycle and vaginal cytology: **Canine and feline endocrinology and reproduction**: 2ª ed. Saunders, 1996.



JOHNSTON, S.; KUSTRITZ, M.; OLSON, P. Feline pregnancy: **canine and feline theriogenology**: 1. ed. Saunders, 2001

NACK, R. A. Theriogenology question of the month. An ectopic fetus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Joplin - Missouri, v. 217, n. 2, p. 182-184, 2000.

PRESTES, N. C.; ALVARENGA, F. C. L. **Obstetrícia Veterinária**: 4ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2006.

SANTOS, Caio Victor Silvestre. **Estudo retrospectivo dos aspectos radiográficos e ultrassonográficos de morte e retenção fetal em pequenos animais**. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Santo Amaro, São Paulo, 2017.

SCHIOCHET, F.; BECK, C. A. C.; PINTO, V.; STEDILE, R.; CONTESINI, E. A.; ALIEVI, M.; YAMAZAKI, P. JURINTZ, D.; BERNARDES, S. B. L. Ovário-histerectomia laparoscópica em uma gata com fetos mumificados- relato de caso. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 361-364, 2007.

SORRIBAS, C.E. **Reproducción en Los Animales Pequeños**: 2. ed. Buenos Aires. Intermédica, 1995.

SOUZA, M. R.; CARVALHO, T. A.; ARAÚJO, W. A. G.; COSTA, W. M. T.; JUNIOR, C. M. J.; CAMPOS, T. M. Natimortalidade e mumificação fetal em suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n. 3, p. 1787-1800, 2012.

TONIOLLO, G.H.; VICENT, W.R.R. **Manual de obstetrícia veterinária**: 1. ed. São Paulo. Editora Varela, 2003.

ZANELLA, E.; SILVEIRA, P. R. S.; SOBESTIANSKY, J. Natimorto, Mumificados e Natimortalidade. In: SOBESTIANSKY J.; BARCELLOS D. E. S. N. **Doenças de Suínos**. Goiânia: Cãnone Editorial, p.564-567, 2007.

ZENI, R. L. A.; RICCI, P.; NOGUEIRA, T. S.; ALMEIDA, R. S.; PAIVA, B. H. A.; SILVA, C. M. G.; JÚNIOR, J. R. P. Aborto interno pós-traumático em gata: relato de caso. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 15, p. 204-208, 2021.



PROLAPSO VAGINAL EM VACA DA RAÇA GIR - RELATO DE CASO

VAGINAL PROLAPSE IN A GIR COW - CASE REPORT

Luyd Otávio Amaral de CARVALHO¹; Amanda Feitosa da CONCEIÇÃO²; Beatriz Lima GUERREIRO²; Beatriz Rosa SILVA²; Carlos Eduardo Nery Costa DINIZ²; Vinícius Daniel Cunha AMARAL²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO²; Sebastião Tavares Rolim FILHO²

¹Bolsista de Iniciação Científica -PIBIC/CNPq, Belém, Pará, Brasil.

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

*E-mail: luydamaral@gmail.com

Abstract

Vaginal prolapse is a pathology that consists of the exit of the organ wall through the vulva, being one of the main affections of domestic animals (Melotti, 2020), and is classified on a scale of 1 to 3, usually affecting cows at the end of pregnancy and, occasionally, after calving, when it may be associated with uterine prolapse (Correa, 2017). The diagnosis for vaginal prolapse is easy to detect, but transrectal palpation is required to determine fetal viability and bladder location. During the anamnesis, it is necessary to analyze the respiratory and cardiovascular parameters (Melotti, 2020). It is also possible that, in vaginal prolapse, spontaneous regression occurs, but in this case, surgical intervention was necessary, with due pre and post-surgical care. In addition, the work demonstrates the importance of constant observation of the animals in the herd, with a focus on pregnant cows, for proper evaluation and implementation of the correct and appropriate treatment.

Keywords: Bovine, reproductive disease, hereditary.

Introdução

A eficiência reprodutiva é um fator de suma importância na pecuária leiteira, está por sua vez está relacionada à capacidade do animal ter ovários funcionais, manter o ciclo estral de forma fisiológica e satisfatória, conceber de acordo com o tempo esperado, restaurar sua função uterina para um novo ciclo, portanto quaisquer alterações nesses parâmetros podem acarretar consideráveis perdas econômicas (ARERO, 2022). Diversas patologias reprodutivas podem acometer vacas de alta produção, entretanto, o prolapso vaginal tem grande importância no terço final da gestação, principalmente em vacas múltíparas, de idade avançada, considerável percentual de gordura, e predisposição hereditária (PRESTES, 2017; MONGELLI, 2022). Esta patologia tem como característica a exteriorização da parede do órgão genital feminino através da vulva, podendo gerar, se alcançar os estágios mais avançados, escoriações, ressecamento e necrose por conta da exposição da mucosa vaginal, segundo Hellú *et al.* (2015). Pode afetar qualquer espécie, entretanto, há maior recorrência em bovinos e ovinos (FRASER, 1996). De acordo com Prestes & Alvarenga



(2017) o prolapso pode ser causado por predisposição hereditária, relaxamento pélvico exagerado, aumento da pressão intra-abdominal, agentes mecânicos, autoperpetuação e alimentação deficiente. O diagnóstico pode ser realizado após anamnese e exame físico, com base nos aspectos clínicos, além de poder-se realizar palpação retal e ultrassonografia para avaliação da viabilidade fetal, caso a fêmea esteja gestante, e o posicionamento da bexiga urinária (MONGELLI, 2022). Desse modo, pela importância da enfermidade, o presente estudo relata um caso de prolapso vaginal total em um bovino (*Bos taurus indicus*) da raça Gir.

Descrição do caso

Um bovino da raça Gir, múltipara, gestante de 6 meses, pesando 500 kg foi atendido em uma propriedade rural no município de Igarapé-Açu, PA. Ao chegar na propriedade, na anamnese, os funcionários relataram que ao sair para pegar os animais pela manhã para a ordenha, notou-se que o animal apresentava exposição total da vagina, sendo esta a terceira vez que o fato se ocorria, segundo os mesmos, porém nas duas últimas vezes, a alteração teve regressão espontânea. No exame clínico revelou-se que os parâmetros respiratórios e cardiovasculares do animal não se encontravam alterados, a mucosa prolapsada apresentava-se normocorada sem áreas de necrose, a temperatura corporal estava dentro dos parâmetros fisiológicos e a vaca estava em movimento. Contudo, o animal se apresentava muito inquieto e com um exame clínico, de fácil visualização, observou-se prolapso vaginal completo. O tratamento utilizado foi cirúrgico, realizando o reposicionamento da vagina para a região anatômica de origem. No entanto, antes do ato, foi realizada anestesia epidural com 5 ml de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor, a mucosa vaginal foi lavada com solução antisséptica de iodo povidona na diluição de 0,05%, visto que a mesma se encontrava com sujidades e poderia acarretar em problemáticas decorrentes para a matriz. Além disso, não foi necessária a utilização de gelo, pois a região não se encontrava com edema considerável, sendo sua organização anatômica retomada sem dificuldades. Posteriormente, foram realizadas duas suturas na forma de “U” deitado (Flessa modificada) na região da vulva e com auxílio de dois fragmentos de equipo hospitalar estéril (onde os fios foram passados, um de cada lado), o fio de sutura foi passado no subcutâneo da pele da região vulvar para evitar rompimento do tecido, sendo então fixadas as suturas e fechados os pontos. No pós-cirúrgico, aplicou-se via intramuscular, 35 ml de Benzilpenicilina procaína na dose de (14,000 UI/kg), 23 ml



de Flunixinina meglumine e 25 ml de Buscofin composto, com duração do tratamento por três dias consecutivos.

Objetivo

Descrever um caso e o tratamento de prolapso vagina em uma matriz da raça gir em uma propriedade rural

Discussão

Segundo Camargos *et al.* (2013), uma parcela dos distúrbios mais comuns que ocorrem durante a fase gestacional, o parto e o puerpério são as distocias, infecção uterina, prolapso e eversão vaginais, retenção de anexos placentários, gestação múltipla e gestação além do tempo previsto. É designado prolapso vaginal a saída da parede do órgão através da vulva, podendo ser de maior ou menor grau. A etiologia da afecção está relacionada ao aumento do estrógeno circulante nas últimas semanas da gestação, o que induz o relaxamento dos ligamentos pélvicos e perineais, associado ao aumento uterino gravídico, facilitando o prolapso (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Os estudos acima corroboram com o relato descrito, visto que a fêmea estava prenhe em seu terço final de gestação, o que pode ter levado a mesma ao prolapso vaginal total. Kahn e Line (2008), apontam que o desenvolvimento do prolapso progride rapidamente, inicia-se como uma dobra semelhante a uma intussuscepção do assoalho vaginal imediatamente proximal à junção vestibulo-vaginal. Dessa forma, ocorre o ressecamento da mucosa vaginal, que se torna irritada e inflamada, evoluindo para a exposição de massa ainda maior (PRESTES *et al.*, 2008), ou seja, causando um prolapso mais extenso. Os prolapso podem ocorrer na parede lateral, dorsal ou ventral da vagina (HELLÚ, 2015). Contudo, no caso abordado, não foi possível evidenciar todos esses aspectos, visto que o animal por receber atendido de forma precoce, ainda não apresentava ressecamento de mucosa, lesões e edema considerável na região vaginal evidenciada pelo prolapso. A matriz apresentava um prolapso de 2º grau, pois mesmo quando em estação, o prolapso vaginal se manteve constante sem sinal de regressão, seguindo a classificação de Dias (2007), onde aborda que a enfermidade pode ser classificada em 4 graus de apresentação, no tipo grau 1º ocorre protusão da mucosa vaginal por meio da vulva, quando o animal está em decúbito, desaparecendo quando este se levanta. No 2º, a protrusão da mucosa vaginal permanece mesmo com o animal na posição quadrupedal. Em seguida, no 3º estágio, o prolapso vaginal e cervical



permanece constantemente exposto e, no 4º estágio, apresenta-se com áreas necrosadas. O diagnóstico do prolapso é facilmente assertivo, pois pode ser feito visualmente com base na anamnese e nos aspectos clínicos, sendo esses aspectos melhor visualizados com o animal em decúbito, segundo Hellú (2015) e Alvarenga (2006), porém, na matriz atendida, ao chegar na propriedade a mesma já estava contida no brete de contenção, não podendo a mesma ser avaliada em decúbito, mas não houve comprometimento da avaliação clínica, visto que o prolapso se encontrava característico como já foi citado. Para o relato abordado, foi utilizada sutura em U deitado modificada, podendo o procedimento cirúrgico variar de acordo com cada caso. Em prolapso total é importante a limpeza e desinfecção com antissépticos pouco irritantes, sendo que, no pós-operatório, é indicado o uso de terapia com antibiótico sistêmico, aplicação de anti-inflamatório não esteroide e lavagens vaginais com água morna (PRESTES, 2008). No caso foram utilizados antimicrobiano de amplo espectro, anti-inflamatório não esteroide e antiespasmódicos, estando de acordo com a dose e via aplicação indicada na literatura (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011). Cabe salientar que a lidocaína é um fármaco de eleição utilizado em animais e promove excelente analgesia transoperatória e pós-operatória, sendo sua dose máxima de 7 mg/kg (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011). Segundo Prestes (2008), no pós-cirúrgico, pode ocorrer a recidiva da enfermidade quando retirados os meios limitantes, no caso, a sutura, sendo necessária a intervenção nesses casos. Durante a avaliação também cabe-se fazer o diagnóstico diferencial para neoplasmas, cistos da glândula de Bartholini, hematoma e hímen persistente (ALVARENGA, 2006). Dessa forma, segundo Adams (2012), é importante estabelecer que o prolapso vaginal é uma das enfermidades reprodutivas mais graves na produção animal, tornando-se cada vez mais comum, visto que sua origem pode ser multifatorial e que a melhor solução para a problemática é o descarte dos animais acometidos, visando evitar a apresentação da enfermidade em seus futuros descendentes.

Conclusão

A produção intensiva de bovinos, relacionada com o elevado nível de produtividade, afeta de forma direta na perpetuação de distúrbios decorrentes de patologias multifatoriais, apresentando etiologia congênita ou ambiental, durante a fase gestacional das matrizes reprodutivas, com destaque para o prolapso vaginal exposto no decorrer do relato apresentado. Portanto, a avaliação minuciosa é um fator imprescindível para o tratamento clínico correto, levando em consideração o



grau da enfermidade que o animal apresenta. Ademais, associado com a mediação clínica, o manejo adequado nas propriedades deve ser introduzido e adaptado visando a intervenção desta afecção no rebanho.

Referências

ALVARENGA, F.C.L. Patologias da gestação. *In*: PRESTES, N.C.; ALVARENGA, F.C.L. **Obstetrícia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p.149-155.

CAMARGOS, A. S. et al. Ocorrência de distúrbios da gestação, parto e puerpério em vacas leiteiras. **Rev. Cient. Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano XI – Número 20 – janeiro de 2013.

DIAS, B.M.L. **Clínica das espécies pecuárias e cirurgias corretivas**. 60f. Relatório final de estágio (Licenciatura em Medicina Veterinária) - Universidade de Trás-os-Montes e Alta Douro, Vila Real.2007

HELLU, J. A. A. Descrição de duas novas técnicas cirúrgicas para o tratamento de prolapso vaginal em vacas zebuínas: vaginectomia parcial e vaginopexia dorsal. **Cienc. Rural**, Santa Maria, 2015.

KAHN, C. M., LINE, S. (org). **Manual Merck de veterinária**. 9. ed. São Paulo: Roca, 2008.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologias do cérvix, da vagina e da vulva. *In*: **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.84-89.

PRESTES, N.C. et al. Prolapso total ou parcial de vagina em vacas não gestantes: uma nova modalidade de patologia? **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.3, p.182-190, jul./set. 2008.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011



TECOMA EM UMA ÉGUA IDOSA DA RAÇA CRIOULA - RELATO DE CASO

THECOMA IN AN ELDERLY CRIOULO MARE – CASE REPORT

Fernanda Carlini Cunha dos SANTOS^{1*}; Fernanda Aquino FRANCO²; Thaisi PIAZZA²; Carlos BONDAN³; Leonardo Porto ALVES^{4**}

¹Docente Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista-Roraima, Brasil

²Médico Veterinário Autônomo

³Docente na Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

⁴Docente no Instituto de Desenvolvimento do Alto Uruguai (IDEAU), Getúlio Vargas/RS e Passo Fundo/RS, Rio Grande do Sul, Brasil

*carlini.fernanda@hotmail.com

**alveslp75@gmail.com

Resumo

O aumento ovariano em éguas pode ser uma condição fisiológica ou patológica, associada a causas neoplásicas e não neoplásicas. No presente trabalho, relatamos o caso de um tecomoma ovariano em uma égua Crioula idosa. Uma égua de 15 anos, da raça Crioula, foi avaliada devido à queixa de emagrecimento progressivo. Ao exame físico todos os parâmetros estavam dentro dos limites de referência. O exame hematológico revelou anemia, hiperfibrinogenemia e neutrofilia, enquanto o exame bioquímico sérico estava dentro dos limites fisiológicos quanto a AST, CPK, FA, creatinina e ureia. À palpação transretal foi observado aumento de volume no ovário esquerdo (4,3 x 2,9 x 3 cm) com consistência lisa. Na ultrassonografia transretal do ovário observou-se padrão heterogêneo, sugestivo de neoplasia. Como forma de tratamento e diagnóstico, foi realizada laparoscopia exploratória, seguida de ovariectomia unilateral, e o ovário foi encaminhado para avaliação histopatológica. Com base nos achados clínicos e exames complementares foi definido o diagnóstico de tecomoma no ovário esquerdo da paciente. O tecomoma é uma neoplasia rara em equinos, porém, devido ao potencial de causar alterações reprodutivas, deve ser considerado como diagnóstico diferencial em éguas com volume ovariano aumentado.

Palavras-chave: células da teca, histopatologia, neoplasia, ovário.

Abstract

Ovarian enlargement in mares can be a physiological or pathological condition, associated with neoplastic and non-neoplastic causes. In the present work, we report the case of an ovarian thecoma in an elderly Crioulo mare. A 15-year-old, Crioulo breed, mare was evaluated due to the complaint of progressive weight loss. On physical examination all parameters were within reference limits. Hematological examination revealed anemia, hyperfibrinogenemia and neutrophilia, while serum biochemistry exam (AST, CPK, FA, creatinine e urea) were within physiological limits. During rectal palpation, a volume increase was observed in the left ovary (4.3 x 2.9 x 3 cm) with a smooth consistency. Rectal ultrasonography showed a heterogeneous pattern, suggesting a neoplasm. As a form of treatment and diagnosis, exploratory laparoscopy was performed, followed by unilateral ovariectomy, and the ovary was referred for histopathological evaluation. Based on findings, the mare was diagnosed with thecoma in the left ovary as a definitive diagnosis. Thecoma



is a rare neoplasm in horses, however, due the potential to cause reproductive alterations, it should be considered as a differential diagnosis in mares with increased ovarian volume.

Keywords: theca cells, histopathology, neoplasm, ovary.

Introdução

A lista de diagnósticos diferenciais para aumento ovariano em éguas deve incluir causas neoplásicas e não neoplásicas (Nie e Momont, 1992). Hematoma ovariano, abscesso e torção devem ser considerados como causas não neoplásicas (Sedrish *et al.*, 1997). Dentre as causas neoplásicas, a mais comum é o tumor de células da granulosa, enquanto o tecomoma é a mais rara (Raooofi *et al.*, 2006). O tecomoma é uma neoplasia benigna do estroma ovariano, originada dos cordões sexuais da gônada embrionária, que originam as células da granulosa e da teca (Raooofi *et al.*, 2006).

Objetivo

Objetivou-se com o presente trabalho, relatar um caso de tecomoma ovariano em égua Crioula idosa.

Descrição do caso

Uma égua de 15 anos de idade, 300kg, da raça Crioula, foi atendida devido à queixa de emagrecimento progressivo. Ao exame físico, todos os parâmetros estavam dentro dos limites de referência. O exame hematológico revelou anemia, hiperfibrinogenemia e neutrofilia. Os resultados do teste de bioquímica sérica estavam dentro dos limites fisiológicos quanto a AST, CPK, FA, creatinina e ureia.

À palpação transretal notou-se aumento de volume no ovário esquerdo, com consistência lisa. A ultrassonografia retal mostrou padrão heterogêneo desta estrutura. Nenhuma dor foi observada durante a palpação retal do ovário afetado.

A laparoscopia exploratória foi realizada de acordo com a técnica descrita por Auer & Stick (2018), com a égua mantida em posição quadrupedal, sob neuroleptoanalgesia e anestesia local. O ovário esquerdo tinha um tamanho aumentado e uma área enegrecida, enquanto o ovário direito apresentava um tamanho reduzido. Suspeitou-se de neoplasia e foi realizada ovariectomia unilateral, via laparoscópica. Em seguida, o ovário esquerdo foi encaminhado para exame histopatológico.



Ao exame histopatológico, macroscopicamente, o ovário media 4,3 x 2,9 x 3 cm, apresentava superfície regular e consistência lisa a firme. Após o corte, o ovário apresentava-se heterogêneo e acastanhado com focos enegrecidos e presença de cistos com conteúdo líquido acastanhado. À microscopia, a amostra avaliada evidenciou a presença de cistos associados à proliferação de células fusiformes dispostas em arranjo sólido, algumas vezes formando turbilhões e com hemossiderose; as células apresentavam citoplasma claro e com vacúolos lipídicos. Com base nos achados, foi confirmado o diagnóstico de tecoma no ovário esquerdo da paciente.

Discussão

O aumento ovariano em éguas pode ser considerado fisiológico ou indicativo de uma condição patológica (MacLachlan e Kennedy, 2002) e, portanto, requer avaliação clínica.

Dentre as causas não neoplásicas, o hematoma ovariano é a mais comum, enquanto entre as neoplásicas, a mais frequente é o tumor de células da granulosa (Hinrichs e Hunt, 1990). Os sinais clínicos das neoplasias ovarianas podem ser inespecíficos, portanto, para se obter um diagnóstico definitivo, devemos associar o histórico do paciente, o exame físico e os resultados de exames complementares, solicitados de acordo com a necessidade de cada caso.

As neoplasias ovarianas podem apresentar padrões semelhantes de ecogenicidade no exame ultrassonográfico (Timmerman *et al.*, 1999), dificultando a realização de diagnóstico diferencial. Assim, exames mais específicos são necessários, como tomografia, histopatologia, imunohistoquímica e dosagem hormonal (Raofi *et al.*, 2006). No presente relato, devido ao custo, optamos por realizar apenas avaliação histopatológica após ovariectomia unilateral.

Conclusão

O tecoma é uma neoplasia rara em equinos, porém, devido ao potencial de causar alterações reprodutivas, deve ser considerado como diagnóstico diferencial em éguas com volume ovariano aumentado, principalmente na categoria de adultas a idosas.

Referências

HINRICHS, K.; HUNT, P. R. Ultrasound as an aid to diagnosis of granulosa cell tumor in the mare. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 99–103, 1990.



MACLACHLAN, N. J.; KENNEDY, P. C. Tumors of the ovary. *In*: Meuten DJ, ed. **Tumors in domestic animals**. 4th ed. Ames, IA: State Press: A Blackwell Publishing Company, p. 547–557, 2002.

NIE, G. J.; MOMONT, H. Ovarian mass in three mares with regular estrous cycles. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p.1043-1044, 1992.

RAOOFI, A.; MARDJANMEHR, S. H.; MASOUDIFARD, M.; ADIBHASHEMI, F.; ASADIAN, P. Tecoma in a Mare: Case Report. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, p. 588-591, 2006.

SEDRISH. S. A.; MACLURE, J.R., PINTO, C., OLIVER, J.; BURBA D. J. Ovarian torsion associated with granulosa-theca cell tumor in a mare. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 211, p. 1152-1154, 1997.

TIMMERMAN, D.; BOURNE, T. H.; TAILOR, A.; COLLINS, W. P.; VERRELST, H.; VANDENBERGHE, K.; VERGOTE, I. A comparison of methods for preoperative discrimination between malignant and benign adnexal masses: the development of a new logistic regression model. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 181, p. 57-65, 1999.



TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL EM CÓRNEA E PREPÚCIO: RELATO DE CASO

TRANSMISSIBLE VENEREAL TUMOR IN CORNEA AND FORESKIN: CASE REPORT

Beatriz de Oliveira RAMOS^{1*}; Jordana Brites JERONIMO¹; Luis Hiago Coutinho MARQUES²; Ádila Rosa Corsini SOUZA²; Luan Junio WUTKE²; João Victor de Andrade ALVES¹; Márcia Rezende FAES³; Isabel Candia Nunes da CUNHA⁴

¹Graduando em Medicina Veterinária na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro (RJ) - Brasil.

²Residente em Reprodução, Obstetrícia e Ultrassonografia de Pequenos Animais na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

³Médica Veterinária com atuação no Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

⁴Professora responsável pelo Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NuARC) na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil.

Abstract

Canine transmissible venereal tumor (CTVT) is a contagious, round cell neoplasm, transmitted by the inoculation of neoplastic cells in mucous or areas of skin that have lost their integrity. It can occur in the reproductive tract, due to sexual behavior, and also in the extra-genital region, such as the subcutaneous, nose, mouth and eye. The diagnosis is made by cytology using fine-needle aspiration (FNA) techniques, imprinting or cytobrush, and the treatment of choice is the application of intravenous vincristine sulfate every 7 days. The present work reports the primary involvement of the cornea by CTVT and the penis and the total remission of the tumor after chemotherapy treatment.

Keywords: Neoplasm, Penis, Dog, Eye, Chemotherapy.

Introdução

O tumor venéreo transmissível (TVT) é um tumor contagioso que afeta cães domésticos e outros canídeos (CHIKWETO, 2013). É transmitido pela inoculação de células neoplásicas em áreas de mucosa ou pele, por reprodução ou comportamento social, ato de lambar, morder ou cheirar áreas infectadas, gerando tumorações extragenitais (CHIKWETO, 2013).

O diagnóstico de eleição é a citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), técnica simples, pouco invasiva e não dolorosa, também pode ser feita uma a técnica de esfoliação, através de uma escova citológica, ou imprint (BIRHAN, 2015). O tratamento preconizado é com aplicações semanais do quimioterápico sulfato de vincristina.

Objetivo

O objetivo do presente trabalho é relatar um caso de tumor venéreo transmissível externo ao globo ocular esquerdo e região de base de pênis de cão, em cão errante, diagnosticado através de citologia.

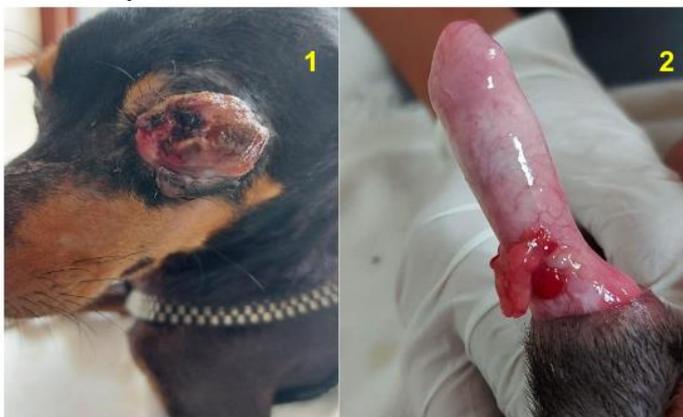
Descrição do Caso

Um cão errante de em torno de 4 anos, recém resgatado, não castrado, SRD, foi encaminhado para o Núcleo de Apoio à Reprodução de Carnívoros (NUARC), no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HVET/UENF) com diagnóstico de TVT em região de globo ocular esquerdo.

A tutora percebeu o animal na rua com nódulo avermelhado em globo ocular esquerdo há cerca de 1 ano (Figura 1), procurou o HVET/UENF onde foram realizados exames complementares, como hemograma completo, bioquímico e citologia, que foi sugestiva de Tumor Venéreo Transmissível.

Ao exame clínico, o animal apresentava temperatura retal 38,7°C, batimentos cardíacos em 80 BPM e mucosas normocoradas, além de TPC 2^o. O aumento de volume no globo não tinha definição de limite e não permitia a confirmação da presença de globo ocular devido a sua dimensão e conformação. Também foi percebido uma massa localizada na base do pênis, após a exposição do mesmo (Figura 2).

Figura 1 e 2 - Lesões de Tumor Venéreo Transmissível apresentadas pelo paciente no presente estudo. 1) Tumoração em córnea, ocultando globo ocular esquerdo e impossibilitando a visão. 2) Lesão na base do pênis, próximo à região de bulbo peniano.



Fonte: Arquivo Pessoal NuARC/HVET-UENF.

O animal, então, foi encaminhado para a quimioterapia, realizada com o antineoplásico vincristina. Na primeira sessão, a dosagem utilizada foi de 0,05 mL/kg, seguido de 5 sessões na

dosagem de 0,025 mL/kg. Após a primeira seção, foi observada mudança na coloração, se tornando menos avermelhado, e diminuição na secreção.

O tratamento foi interrompido na terceira semana, devido à leucocitose e trombocitopenia apresentada no hemograma, sugestivo de hemoparasitose. Após 28 dias de tratamento com Doxiciclina, retornou para continuação do tratamento quimioterápico. O paciente teve alta médica após 6 sessões de quimioterapia, após ausência de células sugestivas de TVT na citologia através de escova citológica, além da remissão total do tumor (Figura 3).

Figura 3 - Remissão da massa tumoral após 6 sessões de quimioterapia.



Fonte: Arquivo Pessoal NuARC/HVET-UENF.

Discussão

O tumor venéreo transmissível canino é uma neoplasia relativamente rotineira no atendimento hospitalar. A maioria dos casos acomete principalmente a genitália externa, quando se tem casos extragenitais a atenção precisa ser redobrada, devido ao aumento da possibilidade metastática. Além disso, é de suma importância que se observe se há algum outro tecido acometido no organismo, ou se esse é o foco de implantação primária, descartando assim a chance de metástase. Com isso, exames complementares são de suma importância. (KROGER *et al.*, 1991; PEREIRA *et al.*, 2005).

Na avaliação clínica do globo ocular observou-se uma massa unitária, avermelhada e firme, com aspectos característicos de TVT. Além disso, observou-se uma lesão em pênis, também característica de TVT e confirmado em citologia. Na análise macroscópica da lesão ocular pode-se observar o comprometimento das estruturas corneanas, conjuntiva, esclera e terceira pálpebra.



Entretanto, após a remissão do tumor observou-se normalidade em relação à reflexos oculares, indicando que não houve ausência de visão, e possivelmente sem o comprometimento de parte interna do olho, como corpo ciliar e íris. De acordo com Das e Das (2000), em TVT ocular metastático, pode-se encontrar lesões em parte interna do olho.

O tratamento preconizado para TVT é o uso de quimioterapia antineoplásica baseada em sulfato de vincristina, na dose de 0,025 a 0,05 mg/kg, com aplicação semanal. Nesse relato, o animal recebeu a aplicação do fármaco intravenoso conforme indicado na literatura, após 6 sessões ele recebeu alta médica. O número de sessões foi determinado devido às alterações presentes no hemograma e na remissão de células neoplásicas no exame citológico.

Após o tratamento quimioterápico o tumor venéreo transmissível apresenta prognóstico favorável, pois o uso de sulfato de vincristina proporciona cura clínica na maioria dos casos (DEN OTTER, 2015; DE TOLEDO E REINA, 2018). Em relação aos casos extra genitais em órgãos nobres como cérebro, pulmão e coração, têm-se o agravo da doença e um prognóstico desfavorável devido ao comprometimento das funções vitais.

Conclusão

O TVT ocular não é uma ocorrência frequente, é de suma importância que se exclua todos os diagnósticos diferenciais, para evitar que se tome decisões precipitadas em relação ao tratamento. Apesar da sua localização extragenital o tratamento com sulfato de vincristina mostrou-se eficaz para esse caso, sendo eficaz para esse tipo de lesão. A melhora clínica foi completa, o globo ocular do animal foi preservado e observou-se a preservação dos reflexos oculares.

Referências

BIRHAN, G.; CHANIE, M. A Review on Canine Transmissible Venereal Tumor: from morphologic to biochemical and molecular diagnosis. **Academic Journal of Animal Diseases**, v. 4, n. 3, p. 185-195. 2015.

CHIKWETO, A. et al. Genital and Extragenital Canine Transmissible Venereal Tumor in Dogs in Grenada, West Indies. **OJVM**. v. 3, n. 2, p. 111-114. 2013.

DEN OTTER, W. et al. Effective treatment of transmissible venereal tumor in dogs with vincristine and IL2. **Anticancer Research**. v. 35, n. 6, p. 3385-3391. 2015.



USO DE AGLEPRISTONE EM HIPERPLASIA MAMÁRIA FELINA (HMF) APÓS PROCEDIMENTO DE CASTRAÇÃO: RELATO DE CASO

USE OF AGLEPRISTONE IN FELINE MAMMARY HYPERPLASIA (HMF) AFTER CASTRATION PROCEDURE: CASE REPORT

Beatriz Lima GUERREIRO^{1*}; Beatriz Rosa SILVA¹; Lana Caroline da Costa CARDOSO¹; Luyd Otávio Amaral de CARVALHO¹; Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO²; Karina Emily Vieira dos SANTOS²; Saulo Autran Moura PALHA²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO³

¹Acadêmica de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

²Residente, Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira (HOVET), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

³Docente, Instituto da Saúde e Produção Animal (ISPA), Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, Brasil.

*email: biaguerreiro697@gmail.com

Abstract

The purpose of this study was to demonstrate the results in the treatment of feline mammary hyperplasia (FMH) with the use of aglepristone in a castrated cat. Aglepristone is a steroid active substance with antiprogesterational activity, and is used in the treatment of mammary hyperplasia, a benign alteration characterized by a rapid and progressive growth of the mammary glands, which occurs after hormonal stimulation of progesterone, of endogenous or exogenous origin. Despite being a promising drug, there is a scarcity of studies relating its use in the treatment of HMF in castrated animals. In the present study, the method of treating the pathology was performed, generating promising results.

Keywords: cat, drug, alizin, mammary glands.

Introdução

A hiperplasia mamária felina (HMF) ou hiperplasia fibroepitelial corresponde a uma alteração do desenvolvimento caracterizada, histologicamente, pela rápida proliferação do epitélio dos ductos mamários e estroma (RAHAL *et al.*, 2003), sendo que essa alteração ocorre em decorrência a um estímulo de progesterona, que pode ter origem endógena ou exógena. Em sua manifestação clínica, é possível perceber as mamas do animal afetadas, pois encontram-se aumentadas, quentes, presença de nódulos, ulceração e necrose cutânea. Ocorrem ainda sinais clínicos sistêmicos, como apatia, anorexia, febre e desidratação (VASCONCELLOS, 2003). Além disso, a aparição dos sinais clínicos se manifesta com mais frequência, também, durante a gestação (LEIDINGER *et al.*, 2011).

Também é importante mencionar que a prevalência dos casos de HMF é maior em gatas não castradas e tratadas com progestágenos sintéticos para controle de cio (CORRÊA, 2019). Para



tratamento desta patologia, um dos protocolos indicados é a realização da mastectomia, no caso de não haver resposta a progestágeno (SEBERINO, 2021). No entanto, atualmente, destaca-se a utilização do aglepristone - fármaco antiprogestágeno - equivalente a um método de tratamento alternativo à mastectomia (FILGUEIRA *et al.*, 2008).

A aglepristona é um antiprogestogênio sintético esteróide relacionado à mifepristona. Esse fármaco age ligando-se a receptores intracelulares de progesterona, assim, bloqueando o estímulo hormonal. Por ser uma alternativa de tratamento relativamente recente, os protocolos não estão bem esclarecidos, contudo, sabe-se que a aglepristone demonstra alta compatibilidade com a progesterona, logo, fundamenta-se seu êxito na terapia da HMF (APPARÍCIO; VICENTE, 2015). Apesar da eficácia dos tratamentos citados, o tratamento de eleição mais eficaz, que cura, além de impedir o ressurgimento, é a castração, pois remove-se a fonte principal de progesterona, que são os ovários. No caso de persistência da doença, dois fatores podem estar ligados: presença de ovários remanescentes ou gatas que receberam fármacos hormonais à base de progesterona injetável, inibidores de cio.

Objetivo

O trabalho, tem como objetivo informar o efeito positivo do fármaco aglepristone utilizado em uma gata que apresentava hiperplasia mamária, após a cirurgia de ovariohisterectomia.

Descrição do caso

O animal foi atendido no Hospital Veterinário Mário Dias Teixeira (HOVET), localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Belém, Pará, sendo da espécie felina, que não possui raça definida (SRD), fêmea, de 1 ano e 3 meses de idade. Através da anamnese, a tutora relatou que há 10 dias aproximadamente a gata apresentou nódulos na região mamária, sendo mais evidente do lado direito, com uma evolução significativa, nodulações de superfície regular com o formato irregular e coalescente, na qual o animal lambe bastante a região. O animal não era castrado, fez o uso de anticoncepcional, no entanto a tutora não soube explicar por quanto tempo a paciente fez o uso, apresentava o cio regular e nunca apresentou episódios de pseudociese. Posteriormente, o animal foi encaminhado ao setor de diagnóstico por imagem do HOVET, para a realização do exame de ultrassonografia.



No exame de ultrassonografia não foi visto nada digno de nota em órgãos abdominais, no entanto foi observado em cornos uterinos esquerdo e direito a presença de pelo menos três vesículas gestacionais, com embriões viáveis, medindo 2,5 cm (comprimento com idade gestacional de aproximadamente 30 dias). Não há evidências de líquido livre abdominal e de linfonodomegalias. A impressão diagnóstica foi sugestiva de esplenomegalia (leve) e gestação.

O animal, ao retornar no hospital foi observado que houve um hiperdesenvolvimento mamário, havendo a necessidade de marcar a cirurgia de ovariectomia, ocorrendo a interrupção terapêutica da gestação. A cirurgia foi realizada no momento em que o animal foi disposto em decúbito dorsal, foi realizada a antisepsia utilizando clorexidina 1%, seguida de álcool 70%. Posteriormente, foi realizada técnica, por uma incisão pré-retro-umbilical, com o auxílio de bisturi em direção a linha alba, divulsionando o tecido subcutâneo até se obter acesso a cavidade abdominal, viabilizando a identificação e remoção dos ovários e do útero gravídico. Logo depois, foi feita a ligadura pelo fio absorvível, fechamento da cavidade abdominal, redução do espaço morto também com fio absorvível e dermorrafia utilizando o nylon em pontos simples isolados. Por fim, foram repassadas as orientações pós cirúrgicas e prescrição medicamentosa.

Por meio da avaliação no retorno da paciente, para a retirada dos pontos, percebeu-se a diminuição da hiperplasia, conseqüentemente o animal não fez aplicação de aglepristone. Através da volta da paciente, foi observado novamente um aumento na glândula mamária, sendo iniciado o protocolo extra bula do aglepristone (Alizin®, Virbac Saúde Animal, São Paulo, SP) por 3 dias (Figura 1).

Figura 1 - Protocolo extra bula utilizado para administração do aglepristone.

DIAS	DOSAGEM	REGIÃO
D1	0,85 ml	LADO DIREITO NA REGIÃO DO FLANCO
D2	0,85 ml	LADO ESQUERDO NA REGIÃO ESCAPULAR
D3	0,85 ml	LADO DIREITO NA REGIÃO ESCAPULAR

No dia do retorno da paciente, notou-se uma melhora significativa, tendo uma boa redução da mama, no entanto ainda persistia um leve aumento, decorrente da possível não resolução do caso, foi recomendado para a tutora a necessidade do procedimento de mastectomia.



Discussão

A hiperplasia mamária felina (HPF), é uma patologia reprodutiva proliferativa com caráter benigno que consiste no desenvolvimento exacerbado e rápido do parênquima e estroma mamário (AMORIM, 2007). Este distúrbio acomete, principalmente, fêmeas felinas não castradas, prenhes ou em diestro, e com histórico de administração de progestágenos sintéticos utilizados de forma indiscriminada para interrupção do cio. Desse modo, implica diretamente na manifestação dessa afecção, pois, a enfermidade é desencadeada a partir de um estímulo hormonal de progesterona, independente da origem, exógena ou endógena.

Ao decorrer da anamnese, a tutora relatou o uso de fármacos contraceptivos no paciente, mas não soube informar o período exato correspondente à administração medicamentosa, deste modo, como especificado na literatura, tal fato colabora, de forma direta, na evolução do quadro de hiperplasia mamária, em decorrência da alta concentração e acúmulo de hormônio exógeno responsável pelo desencadeamento de nódulos na região das mamas do animal (ROBINSON; NOAKES, 2018).

Ademais, foi relatado que o término do período de estro da gata foi de aproximadamente três semanas, considerando o dia da consulta, dessa forma, pode - se considerar que o tecido mamário encontrava - se sensibilizado devido à duradoura ação da fonte endógena de progesterona durante o ciclo reprodutivo do felino.

Segundo Vasconcellos (2003), o protocolo de intervenção baseia - se na interrupção do estímulo hormonal, por meio da ovariossalpingohisterectomia (OSH) e no uso de antiprogestágenos, conseqüentemente, interferindo no desenvolvimento anormal das glândulas mamárias. A mediação cirúrgica terapêutica é uma alternativa viável para a redução do quadro clínico no animal, porém a utilização de métodos alternativos também é comumente aplicada. Atualmente, a administração de aglepristone como interferência farmacológica é frequentemente utilizada no tratamento dessa patologia.

O aglepristone (Alizin®, Virbac Saúde Animal, São Paulo, SP), é um fármaco antagonista que atua bloqueando os receptores uterinos, à vista disso, exerce a interrupção de ações hormonais da progesterona. Com relação à eficácia dos ligantes, em felinos, este medicamento apresenta uma taxa de ligação de nove, competindo pelos receptores uterinos de progesterona que apresentam uma taxa equivalente a um do próprio hormônio (FIENI *et al.*, 2001).



A paciente do relato analisado foi submetida à uma ovariectomia visando a amenização da afecção, mas após o período de retorno para retirada dos pontos observou-se que não ocorreu a redução do quadro clínico de hiperplasia mamária. De acordo com Rahal (2003), na maioria dos casos de HMF ocasionados pela administração indevida de anticoncepcional, a taxa de resposta à redução hormonal somente por intermédio da cirurgia é lenta, pois apenas a retirada do ovário não é suficiente para reduzir os níveis de progesterona acumulados no organismo. Portanto, foi iniciado um protocolo farmacológico com administração do aglepristone objetivando minimizar essa concentração hormonal a partir da inibição dos efeitos estimulatórios de crescimento mamário. Apesar da escassez de elucidações literárias do uso do Alizin® em animais castrados, a resposta quanto à administração do medicamento no caso analisado foi satisfatória, o animal apresentou significativa involução do crescimento mamário, tal fato pode ser explicado pela permanência de receptores de progesterona na região em decorrência da OHS recente, desse modo, permitindo a atuação com eficácia do fármaco quanto ao bloqueio hormonal.

Conclusão

Diante do relato apresentado, é possível identificar que o aglepristone demonstrou ser um fármaco satisfatório ao ocasionar a involução parcial das mamas do animal, mesmo não havendo estudos que comprovem a eficácia do hormônio utilizado após o procedimento de ovariectomia. No entanto, preconiza-se para trabalhos futuros, fazer uma análise experimental com um número amostral considerável, no intuito de consolidar a eficiência do medicamento.

Referências

- AMORIM, F. V. Hiperplasia mamária felina. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 35, supl. 2, p. 279-280, 2007.
- APPARÍCIO, M. & VICENTE, W. R. R. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. **São Paulo: Medvet**, p. 458. 2015.
- CORRÊA, L. T. G. **Hiperplasia mamária felina: terapêutica com o uso do aglepristone**. Monografia (Graduação) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
- FIENI, F.; BRUYAS, J.F.; BATTUT, I; TAINTURIER, D. Clinical use of anti-progestins in the bitch. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J. *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. Ithaca, NY: **International Veterinary Information Service**. 2001.



FILGUEIRA, K. D.; REIS, P. F. C. C.; PAULA, V. V. Relato de caso: Hiperplasia mamária felina: Sucesso terapêutico com o uso do Aglepristone. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1010-1016, 2008.

LEIDINGER, E.; HOOIJBERG, E.; SICK, K.; REINELT, B.; KIRTZ, G. Fibroepithelial hyperplasia in anentire male cat: cytologic and histopathological features. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere**, v. 39, n. 03, p. 198-202, 2011.

RAHAL, S. C.; CAPORALI, E. H. G.; LOPES, M. D.; ROCHA, N. S.; MELERO, F. H. Hiperplasia mamária felina-relato de três casos. **Ars Vet**, v. 19, p. 188-190, 2003.

ROBINSON, B.; NOAKES, D. E. Reproductive physiology of the female. In: *Veterinary reproduction & obstetrics*. Beijing: **Elsevier**, 2018. p. 2-35.

SEBERINO, G. B. et al. Hiperplasia mamária felina: Relato de caso. **Pubvet**, v. 15, n. 1, p. 1-4, jan. 2021.

VASCONCELLOS, C. H. C. Hiperplasia mamária. In: SOUZA, H. J. M. **Coletâneas em medicina e cirurgia felina**. Rio de Janeiro: L. F. Livros, 2003. p. 231-237.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

**ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE
REPRODUÇÃO ANIMAL**

PESQUISA CIENTÍFICA



ADIÇÃO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA ANTICONGELANTE E GLICOSAMINOGLICANOS DA PELE DE TILÁPIA NO MEIO CRIOPROTETOR DO SÊMEN DE CURIMATÃ (*Prochilodus brevis*)

ADDITION OF HIGH CONCENTRATIONS OF ANTIFREEZE PROTEIN AND GLYCOSAMINOGLYCANS FROM TILAPIA SKIN IN THE CRYOPROTECTIVE MEDIUM OF CURIMATÃ (*PROCHILODUS BREVIS*) SEMEN

Yasmim Maia FERREIRA¹; Vanessa Alves PEREIRA²; Yara Silvino SALES¹; Kamila Teixeira DE PAULA¹; Carla Pamela Braga GUIA¹; Marcos Luiz da Silva APOLIANO³; José Ariévilto Gurgel RODRIGUES³; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY¹

¹Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, Ceará, Brasil

²Faculdade de Educação, Ciências e Letras, Iguatu, Ceará, Brasil

³Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, Ceará, Brasil

*Email: yasmim.maia@aluno.uece.br

Abstract

Prochilodus brevis (curimatã) is an endemic fish from the Brazilian semiarid region; however, several factors put its survival at risk. Seminal cryopreservation has shown a good alternative for the development of aquaculture and research shows that the use of antifreeze proteins (AFP) in the cryopreservation solution helps to maintain the composition of the plasma membrane. Likewise, the addition of Glycosaminoglycans from the skin of Nile tilapia (GAGs) also provides antioxidant and protective action for cryopreserved sperm. High concentrations of AFP (10 µg/mL) and GAGs (0.5 mg/mL) were added to the frozen semen, after thawing, the parameters of motility, velocities, sperm morphology and DNA fragmentation were analyzed. It was then observed that the addition of high concentrations of AFP was beneficial for sperm motility and cell membrane integrity, whereas the addition of GAGs improved the rate of normal sperm.

Keywords: CASA, Characiformes, cryopreservation, sperm.

Introdução

Prochilodus brevis, é uma espécie de peixe conhecida popularmente como curimatã comum. É endêmica do semiárido brasileiro, possuindo importância ecológica e econômica nas bacias cearenses (ROSA *et al.*, 2005). Alguns fatores põem em risco a sobrevivência desta espécie, como construção de barragens nos rios e a pesca predatória da espécie, principalmente durante a época de desova (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Tais fatores despertam nos pesquisadores o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias que permitam o cultivo em cativeiro e que aumentem as chances de fertilizações assistidas.

A criopreservação de sêmen tem se mostrado uma boa alternativa para auxiliar nesta problemática. É uma técnica que pode ser benéfica tanto para produção comercial quanto para



programas de repovoamento (SHIMODA, 2004). No entanto, durante o processo de congelamento seminal, danos podem ocorrer aos espermatozoides (crioinjúrias), como a formação de cristais de gelo.

Estudos em ascensão mostram que o uso de proteínas anticongelantes (AFPs) na solução de criopreservação ajuda a manter a composição lipídica da membrana plasmática e estabiliza os espermatozoides durante a congelamento (ABED-ELMDOUST *et al.*, 2018). As AFPs são proteínas encontradas em peixes, bactérias, fungos, insetos e plantas que vivem em ambientes com baixas temperaturas (EWART *et al.*, 1998). Tais proteínas podem fornecer proteção às células, diminuindo o ponto de congelamento, modificando o processo de formação de cristais de gelo, evitando a recristalização e reduzindo as alterações induzidas pela congelamento no padrão proteico (ROBLES *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2017).

Também podem ser adicionados ao meio de congelamento macromoléculas com potencial de antioxidantes naturais. Extraídas da pele de tilápia do Nilo, podem ser utilizadas como potenciais suplementos dos meios de congelamento, a fim de neutralizar os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs), potencializando a viabilidade das células espermáticas após a descongelamento (DO NASCIMENTO *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2021). Diante disto, esse trabalho objetivou avaliar a ação de altas concentrações de AFP (10 µg/mL) e GAGs (glicosaminoglicanos) extraídas da pele de tilápia (0,5 mg/mL) nos parâmetros de cinética, taxa de espermatozoides morfologicamente normais e fragmentação de DNA de *P. brevis*.

Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (550620/2020), e foram utilizados 27 machos de curimatã, oriundos do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes, Fortaleza, Ceará.

Os animais foram induzidos hormonalmente com única dose de Ovopel (0,3 *pellet*/kg). Após 14h, foram sedados em solução à base de óleo de cravo (Eugenol) na proporção de 1:10:10000 (eugenol:álcool:água). Em seguida, tiveram a papila urogenital enxuta e foi realizada uma massagem abdominal no sentido crânio-caudal, e o sêmen foi coletado em tubos de polietileno graduados, onde foram formados 8 *pools* que foram diluídos (1:9 – sêmen:diluidor) em ACP-104 + DMSO 10% (controle) e adicionados 10 µg/mL de proteína anticongelante do tipo 3 (AFP 3) ou



0,5 mg/mL de Glicosaminoglicanos (GAGs) da pele de tilápia. Cada tratamento foi envasado em duas palhetas francesas de 0,25 mL.

As palhetas foram vedadas com álcool polivinílico e mantidas sob refrigeração ($\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos, para o tempo de equilíbrio. Logo após, foram congeladas em *Dry shipper* ($-176\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos e, em seguida, transferidas para um botijão de nitrogênio líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 15 dias, o sêmen de cada tratamento foi descongelado em banho-maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 s e submetido à análises.

As análises de motilidade foram realizadas com auxílio do sistema de análise seminal auxiliada por computador (CASA), por meio do software *Sperm Class Analyser* (SCA, Microoptics – Barcelona - Espanha, versão 3.2). Para isso, sobre a câmara de Makler, $1\text{ }\mu\text{L}$ de sêmen foi homogeneizado com $100\text{ }\mu\text{L}$ de soluções a base de água destilada, de NaCl (220 mOsm) e submetidos à análise. Além da motilidade (%) foram analisados a velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade em linha reta (VSL - $\mu\text{m/s}$) e velocidade média do percurso (VAP - $\mu\text{m/s}$).

Para a avaliação da morfologia espermática, amostras de $5\mu\text{L}$ do sêmen descongelado foram fixadas em $50\text{ }\mu\text{L}$ de formol citrato. Em seguida, foi misturado $10\text{ }\mu\text{L}$ dessa solução com $3\mu\text{L}$ de corante Rosa Bengala. Dessa mistura, retirado $10\mu\text{L}$ e feito o esfregaço em lâmina de vidro. As patologias espermáticas observadas em microscópio óptico (400x) foram espermatozoides normais e as de cauda: enrolada, dobrada, quebrada, corrugada; e as de cabeça: macrocefalia e microcefalia.

Para as análises de fragmentação de DNA, o protocolo de produção de lâminas foi realizado de acordo com Fernandez et al., 2005, na qual quinhentas células espermáticas foram avaliadas em microscópio óptico (1000x) quanto à presença de halo ao redor da cabeça do espermatozoide: células com halo indicam que houve a dispersão da cromatina (DNA íntegro) e células sem halo indicam DNA fragmentado. Para análise estatística, os dados foram analisados pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene quanto à normalidade e homoscedasticidade, respectivamente, e em seguida foram submetidos à ANOVA. Após ANOVA, os dados foram submetidos ao teste de Tukey para comparação das médias. Os dados foram analisados com auxílio do software SigmaPlot na versão 12.0.

Resultados e discussão

Com relação aos resultados obtidos, observou-se que para o parâmetro de taxa de motilidade, a utilização de proteína anticongelante tipo III foi benéfica, não diferindo



estatisticamente do controle, enquanto a utilização de GAGs resultou em baixas taxas de motilidade. Este resultado corrobora com estudos anteriores, que sugerem a utilização de baixas concentrações de polissacarídeos sulfatados da pele de tilápia do Nilo (PEREIRA *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Cinética espermática, taxa de morfologia e fragmentação de DNA do sêmen de *P. brevis* criopreservado com adição de AFP 3 (10 µg/mL) e GAGs (0,5 mg/mL).

	Motilidade (%)	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	Normais (%)	DNA íntegro (%)
Controle	23,4 ± 0,37ab	17,58 ± 3,58a	3,20 ± 0,91a	7,24 ± 3,020a	81,50 ± 6,62a	77,8 ± 8,66b
AFP III	29,2 ± 0,99a	18,9 ± 4,26a	3,49 ± 3,30a	6,99 ± 3,71a	59 ± 7,09b	77,2 ± 10,07ab
GAG	19,6 ± 0,33b	16,9 ± 0,69a	1,61 ± 0,68a	5,42 ± 0,72a	82 ± 4,5a	90,6 ± 6,2a

Com a utilização de altas concentrações de AFPs e GAGs, não foi observada diferença estatística entre os parâmetros de velocidades espermáticas. Embora tais parâmetros não tenham mostrado diferença entre os tratamentos controle e suplementado, o uso dos polissacarídeos ainda pode ser justificado pela manutenção de bons resultados na integridade de DNA (DO NASCIMENTO *et al.*, 2021).

Para o parâmetro de análise morfológica dos espermatozoides, pôde-se observar que a adição de GAGs foi benéfica para o sêmen de *P. brevis*, resultando em maiores taxas de espermatozoides morfológicamente normais, assim como no tratamento controle (sem adição de suplementos). Tais resultados reforçaram que as GAGs atuaram na manutenção da qualidade espermática. tal parâmetro é de suma importância para programas de fertilização *in vitro* (MILIORINI *et al.*, 2011)

As maiores taxas de DNA íntegro foram obtidas nos tratamentos com adição de GAGs e AFPs. As GAGs reduzem EROs que levam ao estresse oxidativo e causam doenças (ALENCAR *et al.*, 2019; JRIDI *et al.*, 2019). Assim, a adição de substâncias com ação antioxidante ao meio de congelamento é importante, pois previne os danos que os radicais livres causam ao DNA celular. As proteínas anticongelantes têm importante ação na proteção contra os cristais de gelo, tal fator oferece proteção também ao DNA espermático.

Conclusão



Pesquisas evidenciam a importância da utilização de suplementos que atuem na produção de EROs e que protejam a membrana espermática contra crioinjúrias. Dessa maneira, este trabalho pôde contribuir com tais estudos, concluindo, portanto, que a adição de Proteínas Anticongelantes pode ser benéfica para a motilidade espermática, assim como a adição de GAGs pode ser igualmente benéfica para melhorias nos parâmetros de morfologia espermática e integridade de DNA de *Prochilodus brevis*.

Referências

- ABED-ELMDOUST, A.; FARAHMAND, H.; MOJAZI-AMIRI, B.; RAFIEE, G.; RAHIMI, R. Metabolic changes in droplet vitrified semen of wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1997). **Cryobiology**, 76, 111-118, 2017.
- ALENCAR, P.O.C.; LIMA, G.C.; BARROS, F.C.N.; COSTA, L.E.C.; RIBEIRO, C.V.P.E.; SOUSA, W.M.; SOMBRA, V.G.; ABREU, C.M.W.S.; ABREU, E.S.; PONTES, E.O.B.; OLIVEIRA, A.C.; PAULA, R.C.M.; FREITAS, A.L.P. A novel antioxidant sulfated polysaccharide from the algae *Gracilaria caudata*: In vitro and in vivo activities. **Food Hydrocolloids**, v. 90, p. 28-34, 2019.
- DO NASCIMENTO, Renata Vieira et al. Use of glycosaminoglycans from *Oreochromis niloticus* skin as an antioxidant supplement for milt cryopreservation of Brazilian bocachico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 5, p. 2959-2978, 2021.
- EWART, K. V.; LIN, Q.; HEW, C. L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 55, p. 271-283, 1999.
- FERNANDEZ, J.L.; MURIEL, L.; GOYANES, V.; SEGRELLER, E.; GONSÁLVEZ, J.; ENCISO, M.; LAFOMBROISE, M.; DE JONGE, C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and Sterility**. v. 84, n. 4, p. 883-842, 2005.
- JRIDI, M.; NASRI, R.; MARZOUGUI, Z.; ABDELHEDI, O.; HAMDI, M.; NASRI, M. Characterization and assessment of antioxidant and antibacterial activities of sulfated polysaccharides extracted from cuttlefish skin and muscle. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1221-1228, 2019.
- MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; ROSA, P.V.; OBERLENDER, G.; PEREIRA, G.J.M.; COSTA, D.V. A morphological classification proposal for curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm damages after cryopreservation. **Aquaculture Research**, v. 42, p. 177-187, 2011.
- NASCIMENTO, M. M.; NASCIMENTO, W. S.; CHELLAPA, N. T.; CHELLAPA, S. Biologia reprodutiva do curimatã comum, *Prochilodus brevis* (Characiformes: *Prochilodontidae*) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 2, n. 2, p. 31-43, 2012



PEREIRA, Vanessa Alves et al. The Effect of Glycosaminoglycans, Extracted from The Skin of Tilapia, in the Sperm Freezing Medium of *Colossoma Macropomum*. **Cryoletters**, v. 42, n. 5, p. 272-282, 2021.

ROBLES, V.; CABRITA, E.; ANEL, L.; HERRÁEZ, M.P. Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: toxicity and protein distribution. **Aquaculture**, v.261, p.1299–1306, 2006.

ROSA, R. S.; MENEZES, N. A.; BRITSKI, H. A.; COSTA, W. J. E. M.; GROTH, F. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da caatinga. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife. Universitária da Universidade Federal de Pernambuco, p.135-181, 2005

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis*** Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 2004. 121 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R J. Brasil. 2004.



ANÁLISE DA CAPACIDADE LIGANTE DE ESPERMATOZOIDES CANINOS CRIOPRESERVADOS UTILIZANDO DILUENTE COMERCIAL INRA-96®

ANALYSIS OF THE BINDING ABILITY OF CRYOPRESERVED CANINE SPERM USING COMMERCIAL EXTENDER INRA-96®

Yuri Gonçalves MATOS^{1*}; Tayná Moura MATOS¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Ana Glória PEREIRA¹; Luana Grasielle PEREIRA¹; Romário Parente dos SANTOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Av. Francisco Mota, 572, Costa e Silva. Mossoró/RN. CEP: 59.625-900;

*E-mail: yurigmatos@gmail.com

Abstract

The aim was to evaluate the efficiency of the commercial extender INRA-96® for the cryopreservation of canine semen using the sperm binding ability assay. Six animals were selected and had their ejaculates collected by digital manipulation of the penile bulb. Samples were submitted to cryopreservation with Tris-egg yolk (20%) or INRA-96® extender, both supplemented with 6% glycerol. Fresh and frozen semen samples were evaluated for sperm binding capacity using the egg yolk perivitelline membrane binding assay. Despite a reduction in the sperm ability was observed after thawing, in comparison to fresh samples, both extenders provided a similar preservation of this parameter, with values of 119.76 ± 9.6 bound sperm for Tris-egg yolk and 123.76 ± 17.34 for INRA-96®. Therefore, the extender INRA-96® can be efficiently highlighted as an alternative for the conservation of the binding ability of cryopreserved canine sperm.

Keywords: Biotechnic, cryoprotectant, fecundation, fertility.

Introdução

Durante décadas, a criobiologia tem sido objeto de estudo para diversas pesquisas, especialmente na área da reprodução, avaliando o comportamento das células espermáticas submetidas a baixas temperaturas (BENSON *et al.*, 2012). A partir da inativação celular, a atividade biológica do espermatozóide entra em repouso, permitindo sua conservação por tempo indeterminado. Por outro lado, a sensibilidade dessas células submetidas a condições térmicas extremas e por longos períodos fora do seu meio fisiológico, também predispõe a efeitos indesejáveis, que podem comprometer a qualidade espermática (KIM *et al.*, 2021).

O sucesso da criopreservação do sêmen canino, descrito por Rowson em 1954, despertou a busca por diluentes com crioprotetores que permitam a conservação dessas células na espécie, reduzindo os danos celulares causados pelo estresse térmico, osmótico e oxidativo durante os



processos de congelamento e descongelamento (KIM *et al.*, 2021). As características ideais para uma solução diluente utilizada na criopreservação de sêmen incluem: uma ação crioprotetora; que não apresente citotoxicidade para o espermatozoide; osmolaridade e concentrações de eletrólitos semelhante ao plasma seminal, portanto uma solução isotônica; componentes nutritivos para formar uma reserva energética; meios preventivos ao crescimento bacteriano; solução tampão que regule o pH e o mantenha semelhante ao meio fisiológico, permitindo a sobrevivência e viabilidade da célula; e, preferencialmente, de fácil preparo e baixo custo (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020).

Nesse sentido, diversas abordagens que buscam atender as necessidades para permitir a conservação das células com menor prejuízo na qualidade espermática são estudadas e aplicadas. O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano – $H_2NC(CH_2OH)_3$) é uma substância hidrossolúvel, com alto grau de pureza e disponível comercialmente, amplamente utilizado como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (Silva, 2005). Entretanto, diluentes à base de Tris necessitam da adição de crioprotetores externos, como a gema de ovo, que se mostra eficiente na criopreservação de células espermáticas de mamíferos (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020), mas podem interferir na avaliação espermática por apresentar partículas residuais que dificultam o processamento e análise da amostra, além de apresentar risco biológico por contaminação microbiana do meio (KIM *et al.*, 2022).

Portanto, aumenta-se a busca por meios diluentes quimicamente definidos, que se tornem potenciais substitutos dos meios convencionalmente utilizados. Nesse sentido, o diluente comercial INRA-96® (IMV Technologies, França), comumente empregado na espécie equina, se torna uma alternativa a ser estudada para demonstrar a eficácia do seu uso em cães. O INRA-96® é um diluente à base de leite, contendo frações de proteínas micelares que exercem função crioprotetora ao espermatozoide. Apesar de destinado principalmente a manutenção da fertilidade do sêmen de garanhões no processo de refrigeração, já foi utilizado na criopreservação de sêmen equino (Fayer-Hosken *et al.*, 2008). Além disso, tem sido relatado sua utilização para outras espécies, como coelhos (CARLUCCIO *et al.*, 2004), caprinos (LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2011) e ovinos (OLIVERA-MUZANTE *et al.*, 2011).

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo avaliar a eficiência do diluente INRA-96® em promover a manutenção da capacidade ligante do espermatozoide canino submetido ao processo de criopreservação.



Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizado em Mossoró, Rio Grande do Norte. Foram selecionados seis cães de criadouros particulares, onde durante o experimento foram alimentados por ração comercial peletizada e com livre acesso a água, de acordo com o manejo diário dos canis. Antes do período experimental, os animais foram submetidos a exame clínico detalhado e avaliação andrológica, considerados clinicamente saudáveis.

O sêmen foi coletado por manipulação digital do bulbo peniano, retendo-se apenas a segunda fração do ejaculado, denominada fração espermática (rica em espermatozoides), para ser avaliada (SILVA *et al.*, 2002). As amostras foram então divididas em duas alíquotas sendo a primeira submetida a diluição com o grupo-controle no qual foi utilizado um diluente à base de Tris, composto por 3,028g de Tris-hidroximetil-aminometano, 1,78g de ácido cítrico monohidratado, e 1,25g D-frutose, dissolvidos em 100mL de água destilada. Após o preparo, 20% da solução foi substituída por gema de ovo, e posteriormente adicionada de 6% de glicerol. A diluição segue conforme previamente utilizada para cães (SILVA *et al.*, 2002). A segunda alíquota de sêmen foi submetida ao grupo-teste, utilizando-se o diluente comercial INRA-96® (IMV Technologies, França), adicionado de 6% de glicerol (BATELLIER *et al.*, 2001), conforme recomendações para o sêmen de equinos. Após a diluição, a concentração final atingida foi de 1×10^8 espermatozoides/mL. As amostras foram refrigeradas a 15° C durante 40 minutos em caixas isotérmicas e estabilizadas a 5° C por mais 30 min em incubadora biológica. Por fim, as amostras foram envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL, e submetidas ao vapor do nitrogênio (5cm acima da superfície) por 5 minutos, sendo então acondicionadas em botijão criobiológico a - 196° C. Após uma semana, as amostras foram descongeladas em banho maria a 37° C por 1 minuto (SOUZA *et al.*, 2015), e os parâmetros espermáticos foram reavaliados para descrição dos valores após o processo de congelamento-descongelamento.

Tanto as amostras a fresco como criopreservadas com ambos os diluentes foram avaliadas quanto ao potencial ligante dos espermatozoides por meio do teste de ligação em membrana perivitelina da gema de ovo, descrito por Silva *et al.* (2018). A técnica consiste na utilização de membranas perivitelinas isoladas de ovos frescos e não fertilizados, com fragmentos de 1 cm² colocados em placas de quatro poços com meio de incubação. Após a avaliação dos parâmetros do sêmen fresco, as amostras foram lavadas em meio de incubação (1:1) e centrifugadas a 700× g



durante 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-diluído no meio, obtendo-se uma concentração de 1×10^8 espermatozoides/mL. A suspensão de espermatozoides foi adicionada à membrana perivitelina. Após 20 minutos em banho-maria ($38,5^\circ\text{C}$), foi feita lavagem para remoção de espermatozoides frouxamente ligados, as membranas esticadas sobre uma lâmina e marcadas com Hoechst 33.358 ($10\mu\text{g/mL}$). Espermatozoides ligados à membrana foram contados em aumento de $400\times$, usando microscopia de epifluorescência. Para cada amostra, foram contados todos os espermatozoides anexados a membrana em seis campos.

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão, e analisados pelo programa Statview 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NY, USA). O efeito dos diluentes sobre as características espermáticas foi avaliado por ANOVA seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e discussão

A membrana perivitelina da gema de ovo de galinha contém proteínas da zona pelúcida homólogas a de outros animais, permitindo a reação acrossomal com espermatozoides de várias espécies mamíferas (BAUSEK *et al.*, 2000). Portanto, a acessibilidade, praticidade e baixo custo, justificam sua utilização no presente teste funcional de espermatozoides caninos, substituindo a necessidade de se coletar oócitos da mesma espécie, que seria de baixa aplicabilidade na prática laboratorial, e oferecendo análise precisa da capacidade fertilizante do ejaculado, conforme evidenciado por Brito *et al.*, 2017.

A avaliação do potencial ligante dos espermatozoides, conforme apresentada na Tabela 01, mostra que o processo de congelação-descongelação promoveu significativa redução ($P < 0,05$) no número de espermatozoides ligados para os grupos utilizando ambos os diluentes, visto que o sêmen fresco proporcionou valores de $160,06 \pm 16,88$ espermatozoides ligados. Entretanto, nenhuma diferença importante foi notada entre os grupos tratados com os diferentes diluentes, observando-se $119,76 \pm 9,6$ espermatozoides ligados para o sêmen descongelado submetido a tratamento com Tris-Gema de Ovo e $123,76 \pm 17,34$ espermatozoides ligados para o grupo submetido ao diluente INRA-96*.

Considerando os valores descritos, o diluente INRA-96* se mostra com resultado tão eficaz quanto o diluente Tris-Gema de ovo, amplamente utilizado atualmente, para manter a conservação da qualidade espermática em cães, incluindo a capacidade ligante de espermatozoides e, desse modo, indiretamente indicando a capacidade fertilizante de tais espermatozoides. Assim, a



diluição em INRA-96® pode ser considerada eficiente na manutenção de parâmetros que indiquem a fertilidade do sêmen, se tornando mais uma alternativa de abordagem para biotécnicas reprodutivas aplicadas aos cães, como por exemplo a produção *in vitro* de embriões caninos, que carece ainda de tanto desenvolvimento. Além disso, esses resultados abrem a perspectiva para utilização do sêmen diluído com INRA-96® em outros canídeos, adaptando sua utilização à preservação de espécies ameaçadas.

Tabela 01 - Valores médios (média \pm EP) e intervalo (min. e max.) para número de espermatozoides ligados a membrana perivitelina de gema de ovo de ganha em sêmen fresco e descongelado de cão com diferentes diluentes.

Parâmetros espermáticos	Fresco	Descongelado	
		Tris-Gema de ovo	INRA-96®
Nº de spz ligados	160,06 \pm 16,88 ^a	119,76 \pm 9,6 ^b	123,76 \pm 17,34 ^b
Min.	125,8	84,0	67,1
Max.	242,0	150,6	192,0

^aLetras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Letras iguais não diferem entre si estatisticamente.

Conclusão

A partir dos resultados, nota-se que o tratamento com diluente INRA-96® pode manter os parâmetros de capacidade ligante dos espermatozoides caninos, avaliado pelo teste de ligação a membrana perivitelina da gema de ovo. Dessa forma, pode ser visto como potencial diluente alternativo para biotécnicas reprodutivas que sejam independentes da motilidade do espermatozoide, como a produção *in vitro* de embriões na espécie canina, abrindo a perspectiva para sua utilização também em outros canídeos.

Referências

BATELLIER, F. V. M. F. et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 181-190, 2001.

BAUSEK, N.. The major chicken egg envelope protein ZP1 is different from ZPB and is synthesized in the liver. **Journal Of Biological Chemistry**, 3 jul. 2000. Elsevier BV.

BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: emerging data over the last 20 years. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 55, n. 2, p. 61-65, fev. 2020.



BENSON, J.D.; WOODS, E.J.; WALTERS, E.M.; CRITSER, J.K.. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-1699, nov. 2012. Elsevier BV.

BRITO, M. M.; LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI, D. S. R.; LÚCIO, C. F.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Sperm-binding to the perivitelline membrane of chicken egg yolk as a functional test for sperm evaluation in dogs. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, v. 54, n. 4, p. 366, 7 dez. 2017. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA).

CARLUCCIO, A. *et al.* Artificial insemination in rabbits: laboratory and field trial with three different semen extenders. **World Rabbit Science**, v. 12, n. 2, p. 65-79, 2004.

FAYRER-HOSKEN, Richard *et al.* Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. **Journal of equine veterinary science**, v. 28, n. 11, p. 672-676, 2008.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. *et al.* Seasonal changes in sperm DNA fragmentation of Murciano-Granadina goats: The compelling case for dynamic assessment. **Small Ruminant Research**, v. 100, n. 1, p. 50-53, 2011.

OLIVERA-MUZANTE, J.; FIERRO, S.; GIL, J. Conception rates in ewes after AI with ram semen preserved in milk-egg yolk extenders supplemented with glycerol. **Reproduction in domestic animals**, v. 46, n. 3, p. 508-512, 2011.

SILVA, A.R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. 2005. Tese de Doutorado. Thesis--Universidade Estadual do Ceará.

SILVA, Andréia M. *et al.* Epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies sperm successfully cryopreserved in Tris extender with 6% glycerol and 20% egg yolk. **Animal reproduction science**, v. 191, p. 64-69, 2018.

SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S. Inseminação artificial em cães. *In*: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Varela, 2002. p.69-95.

SOUZA, Ana Liza Paz *et al.* Sperm characteristics following freezing in extenders supplemented with whole egg yolk and different concentrations of low-density lipoproteins in the collared peccary (Pecari tajacu). **Reproductive biology**, v. 15, n. 4, p. 223-228, 2015.

KIM, Eunji; ALMUBARAK, Areeg; TALHA, Nabeel; YU, Il-Jeoung; JEON, Yubyeol. The Use of κ -Carrageenan in Egg Yolk Free Extender Improves the Efficiency of Canine Semen Cryopreservation. **Animals**, v. 12, n. 1, p. 88, 31 dez. 2021.



ANÁLISE DA OSMOLARIDADE DA FRAÇÃO LÍQUIDA DO SÊMEN DE MACACO-DE-CHEIRO (*Saimiri collinsi* Osgood, 1916)

ANALYSIS OF THE OSMOLARITY OF THE LIQUID FRACTION IN SQUIRREL MONKEY SEMEN (*Saimiri collinsi* OSGOOD, 1916)

Airton Renan Bastos SOARES^{1,2*}; Danuza Leite LEÃO^{1,3}; Karol Guimarães OLIVEIRA⁴;
Mateus de Souza GALVÃO⁴; Aline Amaral IMBELONI⁴; Rafael dos Santos de ANDRADE⁴;
Helder Lima de QUEIROZ³; Sheyla Farhayldes Souza DOMINGUES^{1,2}

¹Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia, Instituto de Medicina Veterinária,
Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia, Universidade Federal do Pará,
Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil.

³Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Tefé, Amazonas, Brasil.

⁴Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará, Brasil.

*airtonrsoares@gmail.com

Abstract

The objectives were to determine the osmolality of the seminal liquid fraction from squirrel monkey (*Saimiri collinsi*), and to verify if there are significant changes over six months of monitoring. Semen was collected from five adult males by electroejaculation. After collection, macroscopic (volume, color and opacity), microscopic (sperm concentration, motility, vigor, plasma membrane integrity and sperm morphology) and physicochemical (pH and osmolality) evaluation was performed. Osmolality was evaluated by the vapor pressure technique, and analyzed in triplicate. Data are expressed as mean \pm SEM, and analyzed by the StatView 5.0 program. The effect of months on osmolality, pH, motility, vigor, plasma membrane integrity and sperm morphology were evaluated by the Kruskal-Wallis test, and differences were located with the Dunn test. $P < 0.05$ was considered significant. Osmolality was significantly higher in the months of June, July and August, when compared to the months of March, April and May, however, there was no change in the other parameters evaluated. The results reinforce the need to develop seminal extenders for each period or season of the year in *Saimiri collinsi*, aiming to maintain sperm viability during the seminal cryopreservation.

Keywords: sperm, vapor pressure, season.

Introdução

O macho de macaco-de-cheiro (*Saimiri collinsi*) é um dos modelos experimentais adotados em estudos sobre a biologia reprodutiva, e no desenvolvimento de técnicas da reprodução, visando a conservação ex situ de todas as espécies do gênero *Saimiri* (SAMPAIO *et al.*, 2017). Assim, a descrição seminal, espermática e a criopreservação convencional em *S. collinsi* já foram realizadas, contudo, há uma deterioração dos parâmetros de qualidade espermática após as etapas de criopreservação (diluição, resfriamento e pós-descongelamento) (OLIVEIRA *et al.*, 2015; 2016).



Sabe-se que o plasma seminal é composto de polipeptídios, enzimas e antioxidantes que mantêm os espermatozoides em condições ideais, reduzindo a peroxidação lipídica e riscos de danos ao DNA (ARAÚJO *et al.*, 2014). São importantes para a manutenção da motilidade (ROSSATO *et al.*, 2002) e da integridade da membrana plasmática (PAN *et al.*, 2018). Do mesmo modo, mudanças na osmolaridade do sêmen podem afetar negativamente funções espermáticas, reduzindo a energia disponível na célula (ROSSATO *et al.*, 2002). Nesse contexto, é de suma importância determinar a osmolaridade do plasma seminal para posteriormente serem estabelecidos diluidores seminais, que mantenha a viabilidade espermática, e permitir um melhor uso em biotecnologias da reprodução.

Um outro fator ao gênero Saimiri, é a ocorrência da sazonalidade reprodutiva (BALDWIN; BALDWIN, 1981). Durante a estação reprodutiva, ocorre o fenômeno de engorda (“fattening”), que é caracterizado pelo aumento sazonal na massa corpórea dos machos (STONE, 2014). Em Saimiri collinsi mantidos em cativeiro, Sampaio *et al.* (2021), observaram alterações seminais como maior volume seminal e pH seminal neutro quando os machos apresentaram a condição “fatted” nos meses de março, abril e maio.

Desse modo, é também possível que, ao longo dos meses do ciclo sazonal, o sêmen desses primatas apresente mudanças nos seus demais componentes e propriedades, inclusive a osmolaridade do sêmen. Logo, o objetivo do presente trabalho é determinar a osmolaridade da fração líquida do sêmen de S. collinsi, e verificar se há alterações significativas ao longo de seis meses de monitoramento, visando a melhoria de protocolos já existentes para a criopreservação seminal de macacos-de-cheiro.

Material e Métodos

Comitê de Ética e Local do Experimento:

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (CEUA N° 34/2019) e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (SISBIO N° 69137-1). As coletas de sêmen foram realizadas no período de março a agosto de 2022. A coleta e avaliação seminal foram realizadas no Centro Nacional de Primatas (Ananindeua, Pará), e a análise da osmolaridade foi executada no Laboratório de Farmacologia Molecular da UFPA (Belém, Pará).



Coleta de Amostras:

As coletas foram realizadas de março a agosto de 2022. Os machos adultos de *S. collinsi* (n=5) foram contidos fisicamente, e anestesiados com cloridrato de cetamina (20 mg/Kg, IM, Vetanarcol, König S.A., Avellaneda, BA, Argentina) e cloridrato de xilazina (1 mg/Kg, IM, Kensol, König S.A., Avellaneda, BA, Argentina). As amostras seminais foram coletadas por eletroejaculação (EEJ), e processadas segundo Oliveira *et al.* (2015). O procedimento de EEJ foi realizado a cada 30 dias, e consistiu de uma sequência de três séries, cada uma com 35 estímulos elétricos contínuos (12,5 - 100 mA), dentro de um intervalo de 30 s entre as séries. Após a EEJ, o volume da fração líquida foi medido com uma pipeta, e avaliado quanto a cor (incolor, amarelada ou esbranquiçada) e opacidade (opaca ou transparente). A fração líquida foi mantida a 37 °C em um incubadora portátil (LabMix; Watanabe Tecnologia Aplicada, Cravinhos, SP, Brasil).

Análise da osmolaridade e parâmetros espermáticos:

A osmolaridade foi determinada com 10 µL de sêmen depositados em um filtro de papel e avaliados pela técnica de pressão de vapor (Wescor Vapro 5520 Vapor Pressure Osmometer, Logan, UT, USA), e analisada em triplicata. O pH do sêmen foi avaliado com 5 µL do sêmen em uma fita colorimétrica (Spezial-Indikatorpapier, Machery-Nagel®, Der Dalheimer Wiese, Mainz – Mombach, Alemanha). Motilidade e vigor espermáticos foram avaliados (objetiva de 10x) com 5 µL depositados em lâmina-lamínula. A concentração espermática foi avaliada (objetiva de 10x) com 10 µL depositados na câmara na câmara de Neubauer. A integridade de membrana plasmática foi avaliada, com 5 µL de eosina-nigrosina e 5 µL de sêmen, realizado o esfregaço em uma lâmina (37 °C) e contados 200 espermatozoides (objetiva de 100x). A morfologia espermática foi avaliada, com 5 µL de rosa bengala a 5 µL de sêmen, realizado o esfregaço em uma lâmina (37 °C) e foram classificados 200 espermatozoides quanto a morfologia (objetiva de 100x).

Todos os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM), e foram analisados pelo programa Statview 5.0 softwares (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). O efeito dos meses na osmolaridade, pH, motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e morfologia espermática foram avaliados pelo teste Kruskal-Wallis, e as diferenças foram detectadas pelo teste de Dunn. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.



Resultados e Discussão

A média \pm EPM do volume da fração líquida do sêmen foi de $56,86 \pm 5,14 \mu\text{l}$ (20–120 μl ; min–max), e cor esbranquiçada ou amarelada, e opaca. A concentração espermática foi de $172 \pm 25 \times 10^6$ espermatozoides/ml.

Em *S. collinsi*, de acordo com nossos resultados, a osmolaridade da fração líquida do sêmen foi significativamente maior nos meses de junho, julho e agosto, quando comparados aos meses de março, abril e maio. Entretanto, não foram detectadas mudanças nos outros parâmetros espermáticos avaliados durante esses meses (Tabela 01). Pode ser que a próstata ou vesícula seminal modifiquem a concentração dos componentes do plasma seminal, e tornando-os hipertônicos nos meses de junho, julho e agosto, diferente dos níveis mais baixos de osmolaridade registrados em março, abril e maio.

Os valores de osmolaridade encontrados nos dois períodos identificados foram superiores aos das soluções utilizadas por Oliveira **et al.** (2015; 2016b) para a diluição (300 Osm) e congelamento (353 Osm) do sêmen de *S. collinsi*. Este fator pode ter influenciado a preservação da qualidade espermática nos protocolos de criopreservação propostos por aqueles autores. Em homens férteis e subférteis, alterações na osmolaridade e no pH inibem a motilidade espermática quando incubados em meios hipotônicos (MAKLER *et al.*, 1981), que reforça o peso dos resultados aqui apresentados, voltados para a necessidade de estudos futuros para avaliar a variação sazonal da osmolaridade, e a utilização de dois diluidores com diferentes osmolaridades para material coletado durante as estações reprodutiva e não reprodutiva, dando suporte para estudos reprodutivos e biotecnologias da reprodução para as espécies do gênero *Saimiri*.

Tabela 1 - Média \pm EPM da osmolaridade (Osm), pH e parâmetros espermáticos de *Saimiri collinsi* (n=5).

	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto
Osm	397 ± 10^b	373 ± 19^b	374 ± 12^b	476 ± 15^a	473 ± 22^a	495 ± 9^a
pH	$7,3 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,3$	$7,7 \pm 0,1$	8 ± 0	$8,2 \pm 0,4$	$8,5 \pm 0,3$
Conc.	$56,66 \pm 34,8$	$133,33 \pm 93$	$90,83 \pm 36,86$	$152,5 \pm 489,13$	$267,5 \pm 576,81$	$279 \pm 333,03$
Mot.	73 ± 17	$53 \pm 8,8$	$91,7 \pm 1,7$	$43 \pm 17,4$	$47,5 \pm 15,5$	$45 \pm 20,6$
Vigor	$3 \pm 0,3$	$3 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	$3 \pm 0,4$	$3 \pm 0,5$	$3 \pm 0,4$



IMP	88±7	62±12,	88±1,7	85±7,9	67,5±27,8	78±7,9
EN	70±2	57,7±17,8	94,7±0,8	77±8,9	58,2±8,2	58±4,9
DMA	1 ± 1	8,5±4,3	0,2±0,2	2,2±1,5	8±2,5	16,2±7,6
DMe	12±16,5	23,2±12,1	3,7±1,4	20,8±7,6	25,2±8,5	16,8±5,5

*Osm: osmolaridade; Conc.: concentração $\times 10^6$ espermatozoides/mL; Mot: % motilidade; IMP: % integridade de membrana plasmática; EN: % espermatozoides normais; DMA: % defeitos maiores; DMe: % defeitos menores
a-b: Letras minúsculas diferentes sobrescritas numa mesma linha, significam diferença estatística.

Conclusão

Apesar do presente estudo representar um período de apenas seis meses de monitoramento, foi possível demonstrar que durante esse período, há uma mudança significativa na osmolaridade da fração líquida do sêmen de *S. collinsi*. Estes resultados reforçam a necessidade de estudos futuros que avaliem a influência da sazonalidade de engorda sobre este parâmetro, além do desenvolvimento de diluidores para cada período ou estação do ano, visando a garantia de manutenção da viabilidade espermática durante a criopreservação.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Centro Nacional de Primatas e ao Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade Federal do Pará pelo apoio técnico durante esta pesquisa.

Referências

ARAÚJO, A.M.S. Plasma Seminal (Revisão). *PUBVET*, v.8, n.18, ed. 267, Art.1775, Setembro, 2014.

BALDWIN, J.D.; BALDWIN, J.I. Primates. The squirrel monkeys, genus *Saimiri*. In: COIMBRA-FILHO A.F.; MITTERMEIER, R.A. **Ecology and Behavior Neotropical**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p. 277–330, 1981.

MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; BETTER, O.S. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertility and Sterility*, v.36, n.4, p.507–511, 1981.

OLIVEIRA, K.G.; LEÃO, D.L.; ALMEIDA, D.V.C.; SANTOS, R.R.; DOMINGUES, S.F.S. Seminal characteristics and cryopreservation of sperm from the squirrel monkey, *Saimiri collinsi*. *Theriogenology*, v.84, p.743–9, 2015.



OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R.; LEÃO, D.L.; BRITO, A.B.; LIMA, J.S.; SAMPAIO, W.V.; DOMINGUES, S.F.S. Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology*, v.72, p.283-9, 2016a.

PAN, C.; WU, Y.; YANG, Q.; YE, J. Effects of seminal plasma concentration on sperm motility and plasma and acrosome membrane integrity in chilled canine spermatozoa. *Veterinary Sciences*, v.21, n.3, p.136-138, 2018.

ROSSATO, M.; BALERCIA, G.; LUCARELLI, G.; FORESTA, C.; MANTERO, F. Role of seminal osmolarity in the regulation of human sperm motility. *International Journal of Andrology*, v.25, n.4, p.230-235, 2002.

SAMPAIO, W.S.; LEÃO, D.L.; SOUSA, P.C.; QUEIROZ, H.L.; DOMINGUES, S.F.S. Male fattening is related to increased seminal quality of squirrel monkeys (*Saimiri collinsi*): Implications for sperm competition. *American Journal of Primatology*, v.1, p.e23353, 2021.

SAMPAIO, W.V.; LEAO, D. L.; SOUSA, P. C.; DOMINGUES, S. F. S. Contribuições da biotecnologia da reprodução sobre os desafios na manipulação do sêmen de primatas do gênero *Saimiri*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 41, p. 222-230, 2017.

STONE, A.I. Is fatter sexier? Male reproductive strategies squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*. In: The 82nd annual meeting of the American association of physical anthropologists, 2014.



ANÁLISE DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO* COM SULFATO DE HIDROXICLOROQUINA

DEVELOPMENTAL ANALYSIS OF BOVINE EMBRYOS CULTURED *IN VITRO* WITH HYDROXYCHLOROQUINE SULFATE

Paula Sabrina Arruda COELHO¹; Izamara do Socorro Ramos RODRIGUES¹; Luciano Cruz PANTOJA^{1,2}; Maykon Damasceno SILVA^{1,3}; Hamilton Silva do NASCIMENTO^{1,2}; Alysson Jorge de Oliveira SOUSA^{1,2,3}; Moysés dos Santos MIRANDA^{1,2}

¹Laboratório de Biotecnologia e Medicina de Animais da Amazônia, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia, Universidade Federal do Pará, Universidade Federal Rural da Amazônia, Pará, Brasil.

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará, Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: paulacoelho.ufpa@gmail.com

Abstract

Chloroquine (CQ) and hydroxychloroquine (HCQ) have well-characterized side effects. In the field of reproduction, these effects are not yet well understood. *In vitro* embryo production (IVP) can be used for reproductive toxicology studies to evaluate the impact of toxic substances on gametes and embryos. The objective of this work was to evaluate the cytotoxicity of HCQ in preimplantation bovine embryos produced *in vitro*. Bovine oocytes were collected at the abattoir, matured *in vitro* for 26h, parthenogenetically activated and embryos (parthenotes) were cultured *in vitro* for 7 days in the presence of HCQ (1, 6, 12 and 24 μ M). Cleavage and blastocyst rates were assessed on the 3^o and 7^o day of culture in a receptive manner. Only treatment with 24 μ M of HCQ reduced the cleavage rate compared to the Control (45.2 vs. 69.6%; $p < 0.05$) with no effect observed at concentrations of 1, 6 and 12 μ M ($p > 0.05$). Regarding blastocyst formation rates on day 7 of culture, only the group treated with 1 μ M of HCQ was similar to the Control (44.4 vs. 43.1%, respectively; $p > 0.05$), while in the other treatments we noticed a gradual and significant reduction ($p < 0.05$) in blastocyst rate as the HCQ concentration used increased, reaching zero the rate of embryos produced in the group treated with 24 μ M of HCQ. In conclusion, HCQ even at low concentrations, can be detrimental to the quality and development of preimplantation embryos.

Keywords: HCQ, IVEP, Toxicology.

Introdução

A cloroquina (CQ) e seu derivado, a hidroxicloroquina (HCQ), são drogas antimaláricas amplamente conhecidas por tratarem doenças inflamatórias, autoimunes e parasitárias (AL-BARI, 2015). Entretanto, o seu potencial antiviral tem sido investigado e, por isso, recentemente, elas foram utilizadas como um suposto tratamento para pessoas acometidas pela COVID-19 em diversos países, mesmo com estudos insuficientes acerca da eficácia dessas drogas para este fim (WANG *et al.*, 2020; MEHRA *et al.*, 2020).



Quando utilizadas corretamente, a CQ e a HCQ apresentam um bom grau de segurança, porém possuem feitos colaterais que são bem caracterizados (DOYNO; SOBIERAJ; BAKER, 2020). No campo da reprodução, esses efeitos ainda não são bem compreendidos, sobretudo no que se refere à fisiologia reprodutiva de fêmeas e do embrião pré-implantação. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) pode ser utilizada como ferramenta para a realização de pesquisa científica básica e dentre as diversas possibilidades de estudos oportunizados com a PIVE, podemos citar os estudos de toxicologia reprodutiva nos quais são relatados o impacto de substâncias tóxicas em gametas feminino e masculino, proporcionando também a avaliação desses estressores à nível embrionário de vários modelos animais (BOLS *et al.*, 2012).

Um estudo recente avaliou o efeito citotóxico da CQ (25, 35, 45 μ M) na maturação *in vitro* de oócitos suínos e mostrou que a CQ afetou negativamente o potencial de desenvolvimento embrionário dos oócitos até o estágio de blastocisto e causou redução do número total de células embrionárias. Além disso, a CQ causou a disfunção lisossomal levando a interrupção da montagem do citoesqueleto e ativou as vias de apoptose e autofagia (MIAO *et al.*, 2019).

No entanto, não há relatos na literatura sobre a avaliação do efeito destas drogas antimaláricas sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantação de mamíferos. Sendo assim, neste trabalho nosso objetivo foi avaliar este efeito utilizando a PIVE em bovinos. Nossa hipótese foi que o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos pré-implantação é prejudicado pela exposição à HCQ.

Material e métodos

Aspectos éticos:

O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Comitê de ética da Universidade Federal do Pará. CEUA nº 9122260821.

Coleta dos ovários e maturação *in vitro* (MIV):

Os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados por aspiração folicular de ovários de matadouro local. Apenas COCs com mais de três camadas de células compactas e com citoplasma homogêneo, foram selecionados e maturados *in vitro* em meio de cultura de tecidos (TCM 199; Gibco BRL, EUA) suplementado com 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 11 μ g/mL de piruvato, 50 μ g/mL de gentamicina, 10% de SFB, 0,5 μ g/mL de FSH (Folltropin - Bioniche



Animal Health, Canadá) e 5,0 µg/mL de LH (Lutropin - Bioniche Animal Health, Canadá) em incubadora com 5% CO₂ e 38,5°C, conforme descrito por Miranda *et al.* (2016).

Ativação partenogenética:

Após 26h de MIV, os COCs foram desnudados por pipetagem em solução de hialuronidase 0,3 mg/mL. Os oócitos desnudos foram ativados partenogeneticamente com ionomicina (5 µM; Sigma, I0634) por 5 minutos à temperatura ambiente, sendo imediatamente incubados por 3h em 6-DMAP (2 mM; Sigma Aldrich, D2629) diluída em meio de cultivo SOF em estufa com 5% CO₂ à 38,5°C. Após 3h de incubação, os presumíveis partenotos foram cultivados *in vitro* em meio de cultivo SOF suplementado com 2,5% de SFB, 50 µg/mL de gentamicina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) por 7 dias em incubadora com 5% CO₂ à 38,5°C. As taxas de clivagem e formação de blastocistos foram avaliadas no 3º e 7º dias de cultivo, respectivamente.

Tratamento com HCQ:

Neste experimento, todos os tratamentos com a HCQ foram realizados na etapa de cultivo mediante a diluição da droga em meio de cultivo SOF. Uma solução estoque de HCQ (0,1M) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi diluída em água Milli-Q e armazenada em freezer. O meio de cultivo SOF contendo HCQ nas concentrações de 1, 6, 12 e 24µM foi preparado a partir da solução estoque, tomando como referência os estudos avaliando a atividade antiviral *in vitro* da droga contra o nCov-19 (YAO *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020) e o estudo que avaliou o uso da CQ na maturação de oócitos suínos (MIAO *et al.*, 2019).

Análise estatística:

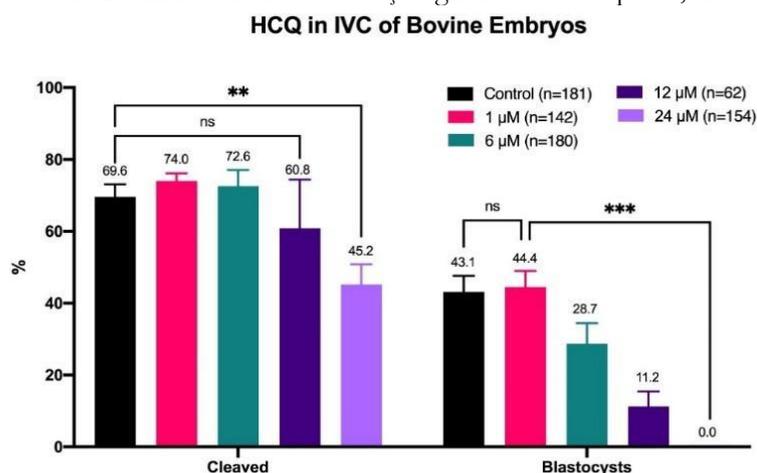
Os dados de análise do desenvolvimento embrionário estão apresentados como média ± SEM. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para a comparação das médias seguida do pós-teste de Tukey quando aplicável. O nível de significância adotado foi o de 5% e o software utilizado foi o Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Resultados e Discussão

Os resultados estão mostrados na Figura 1. Foram avaliados 719 embriões e observou-se que somente o tratamento com 24 µM de HCQ promoveu uma redução da taxa de clivagem no 3º dia de cultivo em comparação ao grupo Controle (45,2 *vs.* 69,6%, respectivamente; p<0,01), não

ocorrendo o mesmo efeito com os demais tratamentos (1, 6 e 12 μM ; $p > 0,05$). Porém, com relação às taxas de formação de blastocistos no 7º dia de cultivo, somente o grupo tratado com 1 μM de HCQ foi semelhante ao Controle (44,4 vs. 43,1%, respectivamente; $p > 0,05$); enquanto que nos demais tratamentos notamos uma redução gradual e significativa ($p < 0,05$) da taxa de blastocistos, conforme o aumento da concentração de HCQ utilizada, chegando a zerar a taxa de embriões produzidos no grupo tratado com 24 μM de HCQ.

Figura 1 - Efeito do uso da HCQ na etapa de cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Os resultados são expressos como média \pm SEM. ** indica diferença significativa com $p < 0,01$ e *** com $p < 0,001$.



Apesar de até o momento não haver nenhum estudo semelhante ao nosso, com relação ao efeito da HCQ sobre o desenvolvimento de embriões mamíferos, o único que mais se aproxima avaliou a utilização da CQ na maturação *in vitro* de óocitos suínos e mostrou que ela reduziu tanto a taxa de clivagem quanto a formação de blastocistos *in vitro* (MIAO *et al.*, 2019).

Uma provável explicação para o efeito observado é a interferência da HCQ no processo de autofagia. A autofagia é um mecanismo essencial para o desenvolvimento embrionário inicial (GRIVE, 2020) para degradação de proteínas maternas, fornecendo nutrientes e aminoácidos para o embrião em desenvolvimento (TSUKAMOTO *et al.*, 2008; TSUKAMOTO; TATSUMI, 2018) e a interrupção do fluxo autofágico nessa etapa pode bloquear o desenvolvimento embrionário (GAO; KHAWAR; LI, 2020). Estudos utilizando inibidores químicos da autofagia (E64d, pepstatina e bafilomicina A1) durante o cultivo de embriões pré-implantação de camundongos, relataram parada dos embriões nos estágios de 4-8 células ou no estágio de mórula, indicando provável influência do processo autofágico em momentos importantes do desenvolvimento



embrionário, como a ativação do genoma e compactação (GAO; KHAWAR; LI, 2020; MOURA; LATORRACA; PAULA-LOPES, 2021).

Sabe-se que tanto a CQ quanto a HCQ são considerados potentes inibidores do processo de autofagia celular (PASQUIER, 2015). Em nosso estudo, observamos que o efeito negativo da HCQ ocorreu nos embriões somente após o 3º dia de cultivo, quando os mesmos estavam aproximadamente no estágio de 8-16 células. Deste modo, supomos que o atraso ou bloqueio no desenvolvimento para o estágio de blastocisto observado em nosso estudo, pode ter sido ocasionado em virtude da supressão de autofagia provocado pelo uso da droga, pois a HCQ também é conhecida pelo seu potencial em inibir de autofagia via estresse lisossomal. Porém, essa hipótese precisa ser investigada em estudos posteriores.

Conclusão

Concluimos que a HCQ, mesmo em baixas concentrações, pode ser prejudicial à qualidade e desenvolvimento de embriões. Nossos achados reiteram a importância do uso racional de HCQ, embora o uso da droga seja considerada segura.

Referências

- AL-BARI, A. A. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 6, p. 1608, 12 nov. 2015.
- BOLS, P. E. J. et al. New applications for bovine IVP technology : from ‘ single oocyte culture ’ to toxicity screening. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 388–394, 2012.
- DOYNO, C.; SOBIERAJ, D. M.; BAKER, W. L. Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1817479>, 2020.
- GAO, H.; KHAWAR, M. B.; LI, W. Essential role of autophagy in resource allocation during sexual reproduction. **Autophagy**, v. 16, n. 1, p. 18, 2 jan. 2020.
- GRIVE, K. J. Pathways coordinating oocyte attrition and abundance during mammalian ovarian reserve establishment. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 8, p. 843–856, 1 ago. 2020.
- MEHRA, M. R. et al. RETRACTED:Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis. **The Lancet**, 2020.



MIAO, J. K. et al. Lysosomal dysfunction disturbs porcine oocyte maturation and developmental capacity by disorganizing chromosome/cytoskeleton and activating autophagy/apoptosis. **Theriogenology**, v. 140, p. 44–51, 1 dez. 2019.

MOURA, M. T.; LATORRACA, L. B.; PAULA-LOPES, F. F. Contextualizing Autophagy during Gametogenesis and Preimplantation Embryonic Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2 jun. 2021.

PASQUIER, B. Autophagy inhibitors. **Cellular and Molecular Life Sciences** 2015 **73:5**, v. 73, n. 5, p. 985–1001, 11 dez. 2015.

TSUKAMOTO, S. et al. Autophagy Is Essential for Preimplantation Development of Mouse Embryos. **Science**, v. 321, n. 5885, p. 117–120, 4 jul. 2008.

TSUKAMOTO, S.; TATSUMI, T. Degradation of maternal factors during preimplantation embryonic development. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 64, n. 3, p. 217, 2018.

WANG, M. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research** 2020 **30:3**, v. 30, n. 3, p. 269–271, 4 fev. 2020.

YAO, X. et al. In vitro antiviral activity and projection of optimized dosing design of hydroxychloroquine for the treatment of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 732–739, 1 ago. 2020.



ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS ÓRGÃOS DO SISTEMA REPRODUTOR FEMININO DO QUATI (*Nasua nasua*, Linnaeus 1766)

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF THE ORGANS OF THE FEMALE REPRODUCTIVE SYSTEM OF THE COATI (*Nasua nasua*, LINNAEUS 1766)

Barbara Cristina Martins MOURA; Isadora Oliveira de CARVALHO³, Francisco Antônio Félix XAVIER JUNIOR³, Thiago Habner de Sousa PEREIRA²; Frederico Ozanam Barros MONTEIRO²; Janaina Serra Azul Monteiro EVANGELISTA³; Ana Kelen Felipe LIMA¹

Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Públicas nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Norte do Tocantins, Araguaína - TO - Brasil (email: martinsbarbaracristina1@gmail.com)

² Universidade Federal Rural da Amazônia- Belém-Pará - Brasil

³ Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza - Ceará - Brasil

Abstract

This work aims to carry out a histological analysis of the female reproductive organs of *Nasua nasua*, contributing to the enrichment of this topic, which still has incipient references. It is known that knowledge of the histology of wild animals is essential for understanding the biological role of the species and promoting its preservation. For this, the samples were obtained from hunters located in the northeast of the Peruvian Amazon and in the central Brazilian Amazon, and stored in a 4% (v/v) buffered formaldehyde solution. Afterwards, standard histological processing was performed. Hematoxylin-eosin (HE), periodic acid-Schiff (PAS) and Masson's trichome histochemical techniques were used. From the analysis, it was observed that the coatis, presented the ovaries and the ovarian follicles and the endometrium similar to the bitch (*Canis familiaris*), and the uterine tube similar to that described in buffalo (*Bubalus bubalis*) and other domestic animals. In this way, the results found through histological analyzes may contribute to the enrichment of the bibliography of *Nasua nasua*, a species of high value for the diversity of the Brazilian fauna.

Keywords: Histology, Reproduction, Coati

Introdução

Os quatis (*Nasua nasua*) são animais que possuem alta capacidade de adaptabilidade aos ambientes em que são inseridos (BEISIEGEL, 2001), o que propicia o aumento em sua densidade populacional. Esse comportamento permite a permanência dos quatis em florestas urbanas, que interligam as áreas silvestres e domésticas, podendo elevar o risco de transmissão de zoonoses (RAMIREZ *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2006; SOUZA JÚNIOR *et al.*, 2006).

A morfologia do sistema reprodutor de animais domésticos já está bem descrita na literatura, porém o mesmo não acontece com os animais silvestres (SADDI, 2014). Conhecer os aspectos morfofisiológicos em animais silvestres é de suma importância, pois permite que essas informações auxiliem tanto no diagnóstico clínico, como na caracterização da puberdade e



maturidade sexual, para um possível manejo reprodutivo da espécie. Desta forma, os resultados encontrados através de análises anatômicas, macro e microscópicas podem contribuir para o conhecimento das características espécie-específica ou de subgrupos da imensa diversidade da fauna brasileira (FERRERA *et al.*, 2015).

O presente trabalho tem como objetivo a descrição histológica dos órgãos do sistema reprodutor feminino do quati (*Nasua nasua*).

Materiais e métodos

Locais de estudo:

O estudo foi realizado em duas áreas na região da floresta amazônica. A primeira área, o rio Yavari-Mirín (YMR, S 04 ° 19,53; W 71 ° 57,33) está localizado no nordeste da Amazônia peruana e é uma área contínua de 107.000 ha de florestas predominantemente de terras altas, na qual uma única comunidade indígena de 307 habitantes é encontrada na região. O segundo local, a Reserva de Desenvolvimento Sustentável Amanã (ASDR, S 01 ° 54,00; W 64 ° 22,00), é uma área protegida de 2.313.000 ha localizada na Amazônia Central Brasileira, entre os rios Negro e Japurá, com uma população de aproximadamente 4.000 ribeirinhos, encontrados em 23 comunidades e alguns assentamentos isolados.

Coleta e processamento de amostras biológicas:

As amostras foram obtidas por meio de caçadores locais treinados para remover todos os órgãos abdominais e pélvicos completos com a região perineal e armazená-los em solução tamponada de formaldeído a 4% (v/v). Uma vez que os caçadores não consomem esses materiais, qualquer procedimento invasivo ou qualquer mortalidade adicional para o propósito do estudo foi evitado.

Processamento das amostras:

Imediatamente após a coleta, as amostras foram lavadas em álcool 70%, seguido de lavagem em solução salina 0,9% (NaCl). Os tecidos foram então fixados em formol 10%, desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados e, finalmente, os fragmentos foram incluídos em parafina para a realização de cortes seriados a intervalos de 3 µm. As lâminas foram montadas a cada 5ª secção e coradas com Hematoxilina-Eosina, PAS, tricrômio de Masson, e posteriormente montadas e analisadas em microscópio óptico utilizando magnificação de 400x e 1000x vezes.



Resultados e discussão

Os ovários descritos neste trabalho apresentam duas regiões distintas, a zona cortical e a zona medular, na qual a zona cortical é revestida por um epitélio com células cúbicas simples, cujo epitélio é sustentado pelo tecido conjuntivo denso não modelado, formando a túnica albugínea. Nesta região estavam inseridos um conjunto de folículos primordiais, folículos primários (Fig 1 A), secundários e folículos terciários (Fig 1 D). Já a zona medular era composta por tecido conjuntivo frouxo, bastante vascularizada.

Os folículos primordiais presentes na zona cortical eram compostos por um oócito envolto por uma única camada de células pavimentosas, e os folículos primários possuíam uma única camada de células cúbicas circundando o oócito. Já os folículos secundários apresentaram várias camadas de células cuboides ao redor do oócito.

Semelhante a Saddi (2014), neste trabalho foi possível observar folículos terciários como evidenciado na Fig 1 D, onde o ovócito apresenta um grande antro e circundado por células da granulosa para a mesma espécie (*N. nasua*). Em cadelas (*Canis familiaris*), e Diagone (2005) cita que o tecido epitelial nos folículos se diferenciam a partir do folículo primordial, variando de pavimentoso a cúbico.

Na tuba uterina observou-se uma camada pregueada (istmo), composta por um epitélio simples colunar, rodeado por um tecido conjuntivo frouxo, com duas camadas de músculo liso; e nas laterais pode-se visualizar a mesossalpinge (Fig 3). Essa descrição é semelhante à encontrada em Aires (2003) em búfalos (*Bubalus bubalis*) e outros animais domésticos (DELLMANN & BROWN, 1982; ELLINGTON, 1991).

Figura 1 - Micrografia do ovário de *N. nasua* na região cortical: A Folículo primário - magnificância 100x e C folículo primordial - magnificância 400 x. D. folículo terciário -magnificância 100 x.

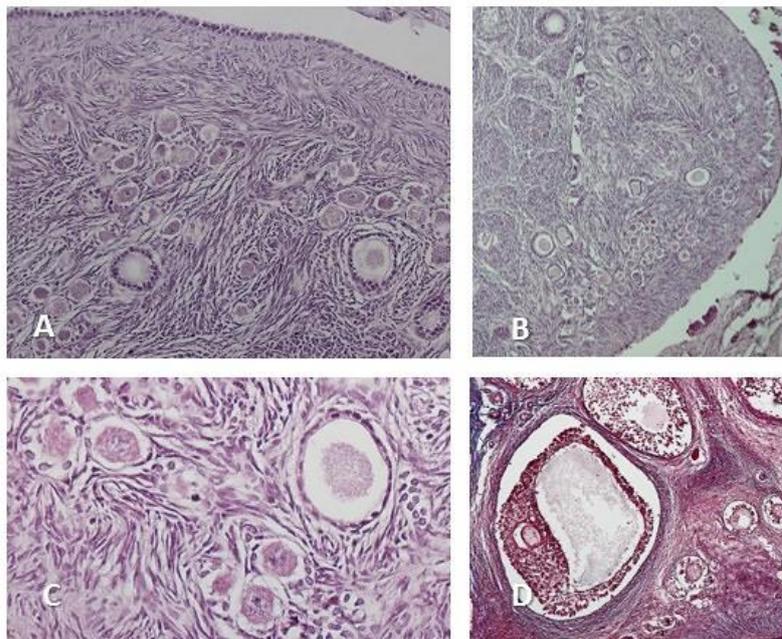
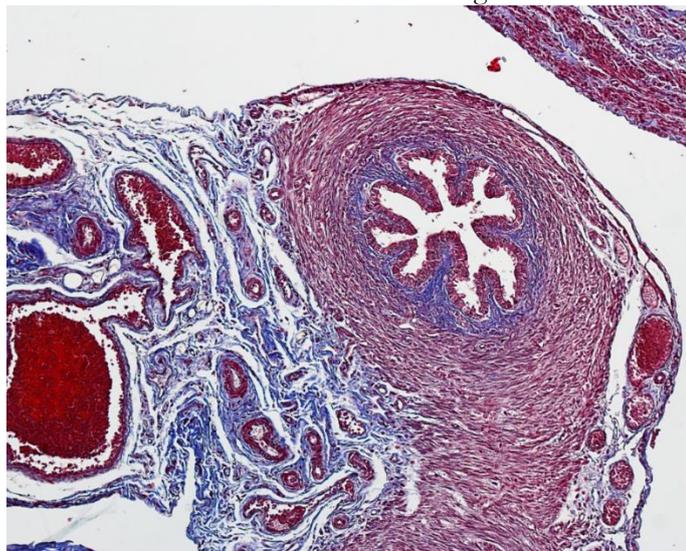


Figura 2 - Micrografia da tuba uterina de *N. nasua*, corte transversal, com epitélio colunar simples e lamina própria. Notar musculatura lisa bem desenvolvida - magnificância 100 x.



Conclusão

Este trabalho possibilitou a descrição histológica de parte dos órgãos do sistema reprodutor feminino de quati (*Nasua nasua*, Linnaeus 1766), ressaltando a descrição dos ovários, folículos



ovarianos e tuba uterina. Os resultados obtidos podem dar suporte aos estudos reprodutivos desta espécie, visando a conservação tanto da referida espécie como de outros procionídeos.

Referências

AIRES, MARLÚCIA BASTOS. Aspectos histológicos do útero, tuba uterina e ovário de búfalos (*Bubalus bubalis*) / Marlúcia Bastos Aires. –Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

BEISIEGEL, BM. Notas sobre o quati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) em uma área de Mata Atlântica. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 61, n. 4, pág. 689-692, novembro de 2001.

DELLMANN, H. D., BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397p.

DIAGONE, KAREN VICENTE. **Histologia e morfometria do aparelho reprodutor de fêmeas submetidas à ovariosalpingo-histerectomia (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758)** / Karen Vicente Diagone. – – Jaboticabal, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2005

ELLIGTON, J. E. The bovine oviduct and its role in reproduction: a review of the literature. **Cornell Vet.**, v.81, p.313-28, 1991.

FERRERA, E. A; EBONE, C.; BRITO, M.C; WILGES, C. H.M; SILVA, A.A, MARTINEZ-PEREIRA, M.A. Importância dos estudos aplicados de anatomia animal para a preservação de animais silvestres. **XX Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. 2015. UNICRUZ- Cruz Alta/RS.

RAMIREZ, L.; DÁVILA, A.M.R; VICTÓRIO, A.M; SILVA, R.A.M.S; TRAJANO, V. J.A. M. 1997. Measurements of *Trypanosoma evansi* from the Pantanal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 92, 483-484.

RODRIGUES, A.F.S.F; DAEMON, E.; MASSARD, C.L. 2006. Ectoparasitos de quatis *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae) em uma floresta urbana no sudeste brasileiro. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**. 58, 969-971.

SADDI, Thelma Michella. **Aspectos histológicos de órgãos do sistema reprodutor feminino e glândula mamária de Quati (*Nasua Nasua*, Linnaeus 1766)**. 2014. 84 p. Tese (Doutor em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, GOIÂNIA, 2014.



**ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE ÚTEROS DE CAMUNDONGOS FÊMEAS
TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus*
Stapf ex Wardleworth)**

**HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS OF FEMALE MOUSE UTERI TREATED WITH
ESSENTIAL OIL OF JABORANDI (*Pilocarpus microphyllus* STAPF EX WARDLEWORTH)**

Luciana Rocha FAUSTINO^{1*}; Gustavo Oliveira Monteiro ALVES¹; Dandara Maria Silva
ARAÚJO¹; Maria de Jesus Pereira GOMES¹; Jessica Maria de Jesus Ferreira da SILVA¹; Leiz
Maria Costa VERAS¹; Cleidson Manoel Gomes da SILVA²

¹Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Parnaíba, PI, Brasil; ²Universidade Federal do Sul e Sudeste
do Pará, Xinguara, PA, Brasil.

*lrfaustino@gmail.com

Abstract

Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardleworth, popularly known as jaborandi, is a native plant of Brazilian flora widely used in folk medicine and with different pharmacological activities. However, the effects of jaborandi essential oil on the uterine tissue of female mice have not yet been observed. Thus, the present study was conducted to evaluate the effect of jaborandi essential oil on the morphology of female mouse uterus. Twenty-six female mice were used. The animals were divided into three groups: 0.9% saline solution (control); 50 mg/kg (J50) and 100 mg/kg (J100) of jaborandi essential oil for 5 and 10 days. After the period of administration, the animals were euthanized and the uteri were collected and submitted to histopathological and morphometric analysis. The data obtained were compared by ANOVA followed by Tukey's test, being considered significant when $P < 0.05$. The histopathological analysis did not show major pathological alterations in the studied uterus. By morphometric analysis, there were no significant differences between the endometrial layers of the luminal and stromal epithelium. In addition, glandular diameter measurements did not show significant differences between the groups, although a difference was observed in the number of endometrial glands of the J50 group when the treatment times were compared. In view of the results, the use of jaborandi essential oil did not result in major changes in uterine structures or in greater alterations, being considered non-toxic to the uterus.

Keywords: Toxicity. Biological Products. Uterine Tissue.

Introdução

O uso de plantas medicinais ocorre em todos os cantos do Mundo, gerando impactos econômicos positivos, especialmente em países em desenvolvimento, onde o serviço de saúde moderno é limitado (AGRA *et al.*, 2008). Informações sobre o conhecimento associado às plantas medicinais representam um papel fundamental na descoberta de novos produtos com potencial para o tratamento de inúmeras doenças. Uma importante espécie de planta medicinal é o jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), nativo da região norte e nordeste do Brasil, o qual



tem se destacado em consequência da sua importância econômica e propriedades farmacológicas. Do jaborandi tem sido extraído um óleo essencial, no qual foram identificados diversos alcaloides conhecidos em sua composição, com destaque para a pilorcapina (LIMA *et al.*, 2017), utilizada no tratamento de glaucoma e xerostomia (HENDRICKSON; MOROCCO; GREENBERG, 2004). Também foram relatados seu papel antioxidante (ROCHA *et al.*, 2017), anti-inflamatório e sua atividade antinociceptiva (SILVA *et al.*, 2013; ROCHA *et al.*, 2017), bem como atividade antitumoral *in vitro* (SILVA, 2017). No entanto, apesar de muito utilizada na medicina popular para diversos tratamentos e dos estudos apresentando algumas das atividades de seus compostos, não há relatos na literatura sobre os efeitos do *P. microphyllus* no tecido uterino. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de jaborandi sobre a morfologia do tecido uterino de camundongos fêmeas por meio de análises microscópicas e morfométricas.

Material e métodos

Foram utilizadas 26 camundongos fêmeas (*Mus musculus*), da linhagem Swiss, com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 28-36 g. Os animais foram alimentados com ração apropriada e água *ad libitum*, mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h à temperatura de 22 °C ± 2 em gaiolas forradas. O manejo dos animais foi realizado de acordo com o preconizado pela legislação brasileira e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFDFPar (protocolo 005/19).

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais (n=4 a 5 animais/grupo): controle (0,1 mL de solução salina a 0,9%) e duas concentrações de óleo essencial de jaborandi (50 e 100 mg/kg⁽³¹⁻³³⁾ em solução salina a 0,9%, denominadas J50 e J100, respectivamente) administrados de maneira asséptica diariamente por gavagem por 5 ou 10 dias. Após o período de administração, todos os animais foram eutanasiados por sobredose de anestésico.

Os cornos uterinos de cada animal foram coletados, seccionados transversalmente e fixados em formol tamponado neutro a 10% por 12-24 h em temperatura ambiente. As amostras foram, então, desidratadas, diafanizadas e inclusas em parafina, segundo técnicas habituais. Logo após, os tecidos foram cortados em micrótomo (5 µm), corados com HE e analisados histopatologicamente para observação de lesões ou alterações. Assim, os úteros foram avaliados de forma semiquantitativa em microscópio de campo claro (Primo Star, ZEISS), considerando a presença de alterações como: fenômenos degenerativos, presença e tipo de inflamação, presença de congestão, necrose e a presença de granulomas. Em seguida, foram realizadas avaliações morfométricas em



imagens digitalizadas, utilizando o microscópio de campo claro acoplado a uma câmera digital (Axiocam 105 color, ZEISS) e *software* Zen2Core v2.4 Application Service (ZEISS). Os parâmetros observados foram a espessura das células do epitélio luminal do endométrio, do estroma do endométrio, do miométrio e das glândulas uterinas, sendo contabilizados a cada 10 cortes do órgão na lâmina. A medição do epitélio foi realizada desde a superfície apical até a zona basal das células. O estroma do endométrio foi medido a partir do final da zona basal das células epiteliais até o início do miométrio, enquanto o miométrio foi mensurado do começo da zona miométrica até os limites externos do útero. As glândulas foram avaliadas em cortes transversais e suas espessuras internas (lúmen) e externas (diâmetro total, contabilizando a camada epitelial) foram mensuradas.

Foi realizado uma análise de variância ANOVA seguida de um teste de Tukey através do programa R para o comparativo entre os resultados dos diferentes grupos. Os valores foram representados como média \pm desvio padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Dentre as alterações observadas, a presença de congestão vascular, caracterizada pela presença de muitas células sanguíneas juntamente com a dilatação dos vasos, foi observada em regiões focais em todos os grupos nos dois tempos estudados ($P > 0,05$). Nos úteros de todos os grupos também foi possível observar a presença de células inflamatórias isoladas, sem formação de agregados celulares comuns em quadros de inflamação, nas camadas teciduais ($P > 0,05$). Essa presença de células inflamatórias não foi considerada como um quadro de inflamação devido a um número baixo de células nos tecidos e à não presença de outras modificações teciduais no ambiente decorrentes de uma inflamação (SYMONS *et al.*, 2018); além de ser considerada normal a presença delas em fases distintas do ciclo estral, variando de acordo com a estimulação hormonal no momento do estudo (TURNER; HEALEY; SHELDON, 2012). Alterações associadas a necrose e granuloma não foram observadas em nenhum dos úteros analisados.

Em todos os grupos foi observada a presença de glândulas endometriais com material proteico em seu interior, sendo algumas glândulas com formatos irregulares, tais como achatamento de células epiteliais cúbicas. O desenvolvimento das glândulas uterinas assim como a presença de material proteico em seu interior está relacionada com a fertilização dos animais, tendo como papéis biológicos garantir a sobrevivência e crescimento do conceito, decidualização das células do estroma e desenvolvimento da placenta (SPENCER, 2014; XIAO *et al.*, 2017).



A análise morfométrica das camadas uterinas não demonstrou diferenças significativas entre as camadas do epitélio luminal do endométrio e do estroma endometrial entre os grupos após 5 ou 10 dias de tratamento ($P > 0,05$). As medidas dos diâmetros das glândulas também não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). Ao avaliar o número de glândulas endometriais, também não houve diferenças significativas entre os grupos ($P > 0,05$). No entanto, a contagem das glândulas endometriais dos úteros do grupo J50 diferiu significativamente quando comparado o dia 5 com o dia 10 ($36,28 \pm 13,35$ vs $13,77 \pm 4,19$, respectivamente; $P < 0,05$). Em conjunto, esses resultados demonstram pouca diferença entre os parâmetros avaliados. Apesar do ciclo estral não ter sido determinado nesse estudo, não foi notada diferença quanto a quantidade ou coloração das glândulas entre os grupos, não sendo a fase do ciclo estral fator que tenha afetado na observação do efeito do óleo. A análise da morfologia das glândulas uterinas também demonstrou que não houve diferenças significativas nos diâmetros interno e total entre os grupos ($P > 0,05$), não apresentando assim uma modificação estrutural como a dilatação glandular. Essa possível alteração somente foi relatada na literatura após uso fármacos antineoplásicos, cuja toxicidade é bem descrita (YILMAZ *et al.*, 2018).

Conclusão

A utilização do óleo essencial de jaborandi nas concentrações de 50 e 100 mg/kg não causou mudanças significativas nas estruturas histológicas dos úteros ou grandes alterações, sendo assim, considerado não tóxico ao órgão.

Agradecimentos

À Phytobios – CENTROFLORA por fornecer as amostras vegetais utilizadas no estudo e ao Laboratório de Biotecnologia (BIOTEC/UFDFPar) pela realização das etapas de preparo e análise do óleo essencial.

Referências

AGRA, M. F. *et al.* Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Braz J Pharmacog** [online], v. 18, n. 3, p. 472–508. 2008.

LIMA, D. F. *et al.* Seasonal change in main alkaloids of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth), an economically important species from the Brazilian flora. **PLoS One** [Internet], v. 12, n. 2, p. 1–19, 2017.



HENDRICKSON, R. G., MOROCCO, A. P., GREENBERG, M. I. Pilocarpine toxicity and the treatment of xerostomia. **J Emerg Med.** v. 26, n. 4, p. 429 – 432, 2004.

ROCHA, J. A. *et al.* Anthelmintic, Antibacterial and Cytotoxicity Activity of Imidazole Alkaloids from *Pilocarpus microphyllus* Leaves. **Phyther Res.** [Internet], v. 31, n. 4, p. 624–630, 2017.

SILVA, V. G. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epüsopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **J Nat Prod** [Internet], v. 76, n. 6, p. 1071–1077, 2013.

SILVA JC DA. Identificação de compostos e avaliação citotóxica, antibacteriana, antioxidante e antifúngico do óleo essencial de *Pilocarpus microphyllus* [Internet]. 2017. Available from: <https://repositorio.ufpi.br/xmlui/handle/123456789/1003>

SYMONS, L. K. *et al.* The Immunopathophysiology of Endometriosis. **Trends Mol Med** [Internet], v. 24, n. 9, p. 748–762, 2018.

TURNER, M. L., HEALEY, G. D., SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. **Reprod Domest Anim** [Internet], v. 47, p. 402–409, 2012.

SPENCER, T. E. Biological roles of uterine glands in pregnancy. **Semin Reprod Med** [Internet]. v. 32, n. 5, p. 346–357, 2014.

XIAO, S. *et al.* Acidification of uterine epithelium during embryo implantation in mice. **Biol Reprod** [Internet], v. 96, n. 1, p. 232–243, 2017.

YILMAZ, E. *et al.* The therapeutic effects of curcumin and capsaicin against cyclophosphamide side effects on the uterus in rats. **Acta Cir Bras** [Internet]. v. 33, n. 6, p. 499–507, 2018.



ASSOCIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL (ECC) E BETA
HIDROXIBUTIRATO COM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE VACAS
LEITEIRAS GIROLANDO SUBMETIDAS A PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

ASSOCIATION OF BODY CONDITION SCORE (BCS) AND BETA
HYDROXYBUTYRATE AND WITH REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF GIROLANDO
DAIRY COWS UNDERGOING FIXED TIME ARTIFICIAL INSEMINATION
PROGRAMS (FTAI)

Luyd Otávio Amaral de CARVALHO^{1*}; Lana Caroline da Costa CARDOSO²; Marcos Vinícius de OLIVEIRA²; Mayra Rhayannah Lima de SOUZA²; Moisés Moreira LIMA²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO²; Sebastião Tavares Rolim FILHO².

¹Bolsista de Iniciação Científica -PIBIC/CNPq, Belém, Pará, Brasil.

²Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

E-mail: luydamaral@gmail.com

Abstract

The present study aimed to analyze the body condition score (BCS), a resource used to determine the nutritional condition of the animal based on visual and tactile evaluation, in addition to correlate the blood concentrations of Beta-Hydroxybutyrate (BHB) with reproductive efficiency and milk productivity of animals. Data on whole blood samples and BCS were analyzed on a scale of 1 to 5, from 30 bovine Girolando females on the day of their births. The cows were previously submitted to hormonal synchronization protocols in a farm from the northeast region of Pará, Brazil, bred in a Panicum maximum cv Mombaça pasture regime and energy ration supplementation. The semen of only one girolando bull (5/8) was used and the reproductive protocol of these animals was performed by only one inseminator. It was evidenced that the animals did not present considerable cases of ketosis, noting that the levels of BHB were not significantly relevant in the conception rate of the studied animals. Furthermore, the BCS showed a direct correlation with the conception rate, so they obtained a 25% conception rate in the group of animals with BCS < 3 and the sows with BCS > 3 obtained a conception rate of 44%. In this sense, the studies corroborate the need to prepare the animals for the end of gestation, so that the animals have optimal conditions of BCS and sanity to obtain the best reproductive and productive efficiency of the animals.

Keywords: Nutritional management, dairy, hormonal synchronization.

Introdução

A cadeia produtiva do leite pode ser encontrada, mesmo que em diferentes aspectos, em todas as regiões brasileiras, atuando como uma atividade geradora de renda, tributos e empregos, sendo a sua produção nacional de leite estimada em cerca de 35 bilhões litros, segundo levantamento feito pelo IBGE para o ano de 2020 (IBGE, 2022). Dessa forma, a pecuária leiteira necessita selecionar e manter animais com bons índices de produtividade e eficiência reprodutiva,



a qual é um dos fatores que mais contribui para melhorar o desempenho e a lucratividade dos rebanhos leiteiros (MEDEIROS *et al.*, 2021). Em vista disso, os países tropicais adotam variados sistemas de manejo, sendo estes do intensivo ao extensivo. Contudo, independente do sistema, têm-se percebido problemas na eficiência reprodutiva dos rebanhos, necessitando-se utilizar de programas reprodutivos, como a inseminação artificial (IA) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), para que o intervalo entre partos (IEP) possa ser o mais curto possível, pois devido a problemas cada vez mais frequentes de detecção de cio e queda nas taxas de concepção, o IEP tem se tornado prolongado, além de se notar com os anos, que as matrizes de alto rendimento leiteiro têm apresentado um aumento gradativo em problemas reprodutivos, aparentemente devido a causas multifatoriais (LUCY, 2001). Dessa maneira, enfermidades puerperais e metabólicas (STEVENSON & CALL, 1988), tem demonstrado reduzir o desempenho reprodutivo e, indiretamente, a produção de leite por dia de vida útil da vaca (BRITT, 1985). Assim, a reduzida taxa de prenhez e maior intervalo de partos diminui a produção de bezerros, aumenta as despesas de manutenção das vacas secas e as taxas de descarte. As doenças metabólicas em vacas leiteiras prejudicam a sua eficiência reprodutiva, visto que afetam o balanço energético das matrizes, tornando o mesmo negativo, podendo ocasionar queda da imunidade (GONZÁLEZ & CAMPOS, 2003). Além disso, Butler, 2003, em seu estudo, pôde deduzir que o balanço energético negativo das matrizes, faz com que ocorra um retardo na retomada de ovulação das mesmas. Portanto, em virtude do pressuposto, o presente trabalho propôs-se a analisar o escore de condição corporal (ECC), um recurso utilizado na atividade leiteira para avaliar os programas de nutrição e desempenho reprodutivo, assim como para melhorar a produção leiteira e a saúde dos animais (PATTON *et al.*, 1998), além de avaliar os níveis sanguíneos de beta hidroxibutirato, o qual é o corpo cetônico circulante predominante nos ruminantes (OSPINA *et al.*, 2010B) e reflete a ocorrência ou não da completa oxidação dos AGNE no fígado (LEBLANC, 2005). Além disso, o BHB é o corpo cetônico que tem maior estabilidade na amostra em relação ao acetoacetato ou acetona (HERDT; GERLOFF, 2009). Dessa forma, o intuito do trabalho é verificar o grau de influência destes aspectos na eficiência reprodutiva (ER) de matrizes girolando lactantes submetidas a programas reprodutivos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).



Materiais e Métodos

Entre os meses de janeiro a março de 2022, foram realizadas coletas de informações acerca de ECC e amostras de sangue total de 30 fêmeas bovinas girolando pluríparas nos dias de seus respectivos partos, além de correlacionar as concentrações sanguíneas de Beta-Hidroxibutirato (BHB), sendo estas submetidas a protocolos de sincronização hormonal, em uma fazenda localizada na região nordeste paraense. Todos os animais foram mantidos em regime de pasto *Panicum maximum cv Mombaça* com suplementação de ração energética (18% PB) e (67% NDT), (Andriquetto & Perly, 2002) fornecidas em cochos com 33 cm lineares/ animal, sendo o fornecimento de ração de acordo com o lote de manejo nutricional de vacas em lactação entre 11 e 15 kg L/ dia e > 16 kg L/ dia. Todos os animais utilizados (licença nº 1049270319), eram da categoria de fêmeas pluríparas lactantes, onde as mesmas foram submetidas a um protocolo de sincronização de cio, que consistiu na aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol®, Zoetis Brasil) e uma adição de dispositivo intravaginal contendo 1,9 grama de progesterona (1 uso) (CIDER; Zoetis Brasil), em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0). No Dia 7 (D7), foram aplicados 12.5 mg de Dinoprost trometamina - PGF_{2α} (Lutalyse®), no DIA 9, o dispositivo de P4 foi removido, e aplicado 12.5 mg de Dinoprost trometamina - PGF_{2α} (Lutalyse®), 1 mg de Cipionato de Estradiol (ECP®, Zoetis Brasil) e 200 UI de eCG - (Novormon®). No Dia 11 (D11) todos os animais foram submetidos à IATF. Para a IATF foi utilizado sêmen de um único touro da raça girolando (5/8) e a técnica realizada por um único inseminador. No respectivo dia do parto, foram coletadas informações acerca de escore de condição corporal (ECC) seguindo a metodologia de Houghton *et al.* (1990), considerando o ECC em uma escala de 1 a 5 e amostras de sangue total para a dosagem de beta-hidroxibutirato (BHB), sendo submetidas para análise por meio do dispositivo FreeStyle Optium Neo (Abbott Laboratórios do Brasil Ltda.). Os resultados foram condicionados em planilhas de Excel para posterior análise. Também foram realizadas avaliações ultrassonográficas (Sonoscape A5V®, transdutor linear 5MHz) com a finalidade de diagnosticar as gestações provenientes das inseminações. O diagnóstico de todos os animais foi realizado 30 dias após a IATF. Para avaliar os dados referentes a taxa de concepção de acordo com ECC, utilizou-se o teste de Fisher ao nível de significância de 5% com auxílio do software Bioestat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).



Resultados e Discussão

Os valores de referência para o BHB, segundo Duffield et al. (1998), $BHB \leq 1,1$ mmol/L – reflete na ausência de cetose; $BHB \geq 1,2$ mmol/L cetose subclínica e $BHB \geq 3,5$ mmol/L cetose clínica. Contudo, no presente estudo após a análise do nível de BHB em cada coleta de sangue total da amostra de animais pelo dispositivo FreeStyle Optium Neo, foi constatado que as matrizes não apresentavam cetose clínica ou subclínica, podendo aferir que os níveis de BHB não possuíam representatividade na taxa de concepção da população amostral de animais, visto que os valores variaram entre 0,3 e 0,7 mmol/L. Os autores González e Campos (2003), corroboram em seu estudo que a vacas leiteiras de alta produção e multíparas possuem maior probabilidade de desenvolver a enfermidade, contudo, também é abordado que a doença ocorre entre os dias 8 e 60 do pós-parto, podendo este ser o motivo da amostra de animais não ter indicado status positivo para a cetose clínica ou subclínica, visto que as coletas de sangue total foram realizadas no consecutivo do parto de cada matriz. Por outro viés, a correlação entre o ECC e taxa de concepção demonstrou resultados consideráveis, visto que no grupo de animais que possuíam condição corporal <3 , obtiveram taxa de concepção de 25% (5/21). Contudo, as matrizes com ECC >3 , demonstraram taxa de concepção de 44% (4/9), sendo superior às de matrizes com condições de escore corporal inferiores ao que se é desejado, possuindo um nível de significância de 0,2663 pelo método estatístico de Fisher. Dessa forma, no estudo de Vieira et al. (2005), avaliaram em quatro estações de monta, a condição corporal (ECC de 1 a 5), concluindo que a manutenção da condição corporal acima de 3,0 foi condição necessária para a boa eficiência reprodutiva das vacas na fase de cria. Da mesma forma Cutaia e Bó (2004) verificaram correlação de 90% do efeito da condição corporal (CC) no momento da IATF sobre a taxa de concepção em vacas submetidas a protocolos hormonais, obtendo-se maiores taxas de concepção em programas de IATF com aquelas fêmeas de melhor CC (LAMB *et al.*, 2001). Santos *et al.* (2009), também observaram que a taxa de concepção foi afetada negativamente pelo ECC ao parto e a primeira inseminação artificial. Nessa perspectiva, os estudos corroboram com o trabalho abordado, visto que animais que apresentaram boa condição de escore corporal obtiveram taxa de concepção superior aos que possuíam condição corporal desfavorável, sendo assim necessário, preparar os animais para o final da gestação, no intuito dos mesmos possuírem condições ótimas de ECC e sanidade, para poder ter melhor rendimento produtivo e eficiência reprodutiva.



Conclusão

Em suma, pode-se concluir que o Escore de Condição Corporal está diretamente correlacionado com os índices reprodutivos e produtivos dos animais, sendo assim, a nutrição adequada de determinado rebanho é um fator crucial para a sua produtividade, principalmente durante os períodos próximos à concepção. Outrossim, os resultados obtidos acerca das concentrações de BHB não apresentaram significância diante da taxa de concepção das vacas leiteiras.

Referências

- BRITT, J.H. Enhanced reproduction and its economic implications. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.1585-1592, 1985.
- CUTAIA, L.; BÓ, G. A. Factores que afectan los resultados en programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría utilizando dispositivos com progesterona. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN BOVINA, 1., 2004, Barquisimeto. Anales... Barquisimeto: [s.n], 2004. p. 109-123
- DUFFIELD, T.F. et al. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2866-2873, 1998.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; CAMPOS, R. Indicadores metabólico-nutricionais do leite. In: GONZÁLEZ, F.H.D., CAMPOS, R. (eds.): **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.31-47. 2003.
- HERDT, T. H.; GERLOFF, B. J. Fatty Liver in Dairy Cattle. In: **Current 103 Veterinary Therapy: Food Animal Practice**. 5. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009. p. 146-149.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/indicadores.html>. Acesso em: 02 Novembro 2022.
- LAMB, G. C. et al. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2 α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. **Journal of Animal Science, Champaign**, v. 79, p. 2253-2259, 2001.
- LEBLANC, S. J.; LESLIE K. E.; DUFFIELD T. F. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 88, p. 159-170, 2005.
- LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J Dairy Sci**, v.84, p.1277-1293, 2001. Marcatti Neto A, Ruas JRM, Amaral R, Menezes AC. Bezerros terminais de corte podem viabilizar sistemas de produção de leite. **Inf Agropec**, v.25, p.25-31, 2004.



MEDEIROS, M. N. et al. Estratégia de protocolo hormonal baseado na antecipação de PGF2 α para melhorar a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras submetidas a transferência de embriões em tempo fixo (TETF). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, 2021

OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL T.; et al. Associations of elevated nonesterified fatty acids and β hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **J. Dairy Sci.** v. 93, p. 3596–3603, 2010b.

PATTON, R. A., BUCHOLTZ, H. F., SCHMIDT, M. K., HALL, F. M. Body condition scoring: a management tool. **Dairy Guide**, East Lansing, Michigan, 6 p., Sept. 1998.

STEVENSON, J.S.; CALL, E.P. Reproductive disorders in the periparturient dairy cow. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2572-2583, 1988.

SANTOS, J.E.P.; RUTIGLIANO, H.M.; SÁ FILHO, M.F. Risk Factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.110, p.207-221, 2009.

VIEIRA, A. et al. Fatores Determinantes do desempenho reprodutivo de vacas nelore na região dos cerrados do Brasil Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6, p. 2408-2416, 2005.



AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE SOBRE AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE CRIADAS NA BAHIA

EVALUATION OF ENVIRONMENT-GENOTYPE INTERACTION ON REPRODUCTIVE TRAITS IN NELORE FEMALES RAISED IN BAHIA

Hélen Larissa da Cruz OLIVEIRA^{1*}; Taiane Nogueira dos SANTOS²; Caio Victor Damasceno
CARVALHO³; Thereza Cristina Calmon de BITTENCOURT⁴

¹Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB – Barra – Bahia –
Brasil.

²Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB – Barra – Bahia –
Brasil.

³Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB – Barra – Bahia –
Brasil.

⁴Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia – UFBA – Salvador – Bahia
– Brasil.

*E-mail: helenlarissa43@gmail.com

Abstract

The climatic and environmental diversity of the state of Bahia is one of the factors that can influence the expression of characteristics of economic interest for Nelore cattle, and the expression of these attributes occurs from the genotype-environment interaction. The genotype-environment interaction can lead to a change in the classification of progenies of sires and matrices created between states and their different regions. Data provided by the Brazilian Association of Zebu Breeders, belonging to the state of Bahia, were used in order to evaluate the occurrence interaction on the reproductive characteristics of the interval between the first and second calving and the interval between calving of Nelore females in the state of Bahia. The results of the genetic correlation analysis showed a significant effect of the genotype-environment interaction on the characteristics studied in the regions of the state, and therefore indicating that different genetic groups act in the phenotypic determination of the reproductive characteristics in bovine Nelore females raised in the state, meaning that progenies of genetically superior animals in a region may not show the same results if their progenies are raised in different regions of the state of Bahia.

Keywords: beef cattle, zebu, genetic parameters.

Introdução

A pecuária bovina de corte nacional está sustentada na utilização de zebuínos, animais de genótipos da subespécie *Bos taurus indicus* (CEZAR *et al.*, 2005). Na região Nordeste o rebanho bovino tem crescido consecutivamente nos últimos anos, com destaque para o estado da Bahia por sua grande extensão territorial e também pelo efetivo total de 11,8 milhões cabeças de gado, ocupando a 7ª posição no cenário nacional (IBGE, 2021).



O estado da Bahia apresenta regiões com imensa diversidade climática e ambiental, sendo apontado por Carvalho *et al.* (2017) como um dos fatores que pode influenciar na expressão das características de interesse econômico para os bovinos da raça Nelore, e por essa razão, é importante a avaliação genética dos animais criados em variadas regiões, visto que, para a maioria das características de importância econômica dos bovinos, a expressão sofre interferências da interação genótipo-ambiente (IGA). O conhecimento do efeito da IGA é fundamental durante o processo de seleção, pois reprodutores com progênes de alta performance em uma região, ou sistema de produção, podem não expressar esse potencial genético quando submetidos a ambientes contrastantes, sendo assim, os parâmetros de escolha são modificados de acordo com as condições ambientais (ALENCAR *et al.*, 2005).

Vários estudos trabalham com a IGA no país, porém ainda há escassez de trabalhos que avaliem a interação genótipo-ambiente no Nordeste. Por esse motivo, o presente trabalho objetivou avaliar a presença da IGA sobre as características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore criadas em três diferentes regiões do estado da Bahia.

Material e métodos

Para a realização do estudo, foram utilizadas informações fenotípicas de animais da raça Nelore de um banco de dados cedidos pelo Programa de Melhoramento genético de zebuínos (PMGZ), conduzido pela Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ). O banco de dados era constituído de informações de fêmeas da raça Nelore criadas em fazendas distribuídas em diversas regiões do estado da Bahia, sendo formado pelas seguintes variáveis: Localização da fazenda (município); identificação da fazenda; informações do pai e mãe; data de nascimento do animal; idade ao primeiro parto (IPP) e intervalo entre o primeiro e segundo parto (IEP 12). Foi necessário a criação dos grupos de contemporâneos e construção de novas variáveis, sendo elas, o ano de nascimento e o mês de nascimento dos animais.

Após esta etapa, foram criadas as estações de nascimento, definidas em quatro estações (1 - janeiro a março; 2 - abril a junho; 3 - julho a setembro; e 4 - outubro a dezembro). Para realização das restrições no banco de dados foi utilizado o software SAS 9.2 (SAS 9.2 SAS Institute, Cary, NC, USA). Para o estabelecimento das correlações genéticas considerou a existência de três regiões no estado (R1, R2, R3), definidas por Carvalho (2017), considerando a diversidade existente entre os ambientes e manejos adotados para a criação de bovinos de corte no estado. O estabelecimento das correlações genéticas entre as três diferentes regiões do estado, foram verificadas considerando



a mesma característica como uma característica distinta em cada um dos distintos ambientes de criação, sendo considerada a presença da IGA quando a correlação for inferior a 0,80 (ROBERTSON, 1959). Para a obtenção das correlações genéticas foi utilizado a análise utilizando o modelo animal, sendo considerado o efeito aleatório do próprio animal e o efeito fixo do grupo de contemporâneo, para essa análise utilizou-se os softwares GIBBS2F90 e POSTGIBBSF90, utilizando-se 1000000 ciclos e burn-in de 100000 (MISZTAL *et al.*, 2014).

Resultados e Discussão

A tabela 1 apresenta os resultados médios obtidos com a análise descritiva do intervalo entre o primeiro e o segundo parto (IEP 12) e da idade ao primeiro parto (IPP).

Tabela 1 - Análise estatística descritiva para IEP 12 e IPP de fêmeas Nelore criadas no estado da Bahia.

Característica	Nº de animais	Média ± DP
IEP 12	53461	602,96 ± 223,683
IPP	86187	1372,67 ± 406,69

Tabela 2 - Correlação genética para idade ao primeiro parto e intervalo entre primeiro e segundo parto de fêmeas Nelore criadas no estado da Bahia.

Características		R1	R2	R3
IPP	R1	1,000	0,166	0,016
	R2		1,000	0,043
	R3			1,000
IEP 12	R1	1,000	0,323	0,29
	R2			0,44
	R3			1,00

O intervalo de partos médio do rebanho nesta análise foi de 602,96 dias, valor longe do ideal que seria de 365 dias, para obtenção de um bezerro ao ano (PEROTTO *et al.*, 2006b). Já os resultados para IPP das novilhas foram de 1372,67 dias. As médias fenotípicas observadas estiveram dentro dos limites de normalidade para a raça Nelore, em que os valores médios se apresentaram entre 1045 - 1449,59 dias (CARVALHO, 2017).



Verifica-se que os resultados médios para as características reprodutivas de IEP 12 e IPP estão em conformidade com os limites inferiores e superiores apontados pela literatura. De acordo com Azêvedo *et al.* (2006b), a ocorrência desses valores médios contrastantes, se devem principalmente em comparação com rebanhos localizados nas regiões Norte e Nordeste, com aqueles verificados em outras regiões do país que são mais favoráveis à pecuária, principalmente relacionada a nutrição e manejo reprodutivo (AZEVEDO *et al.*, 2006b).

Conforme Perotto *et al.* (2006b) os sistemas de criação do Brasil geralmente tendem a ter IEP mais longo. Já em relação a IPP, de acordo com Azêvedo *et al.* (2006b) a puberdade tardia nos rebanhos zebuínos no Brasil se relaciona a estacionalidade da produção de forragens, associada à falta de suplementação alimentar na primeira estação seca após o desmame, quando a fêmea ainda está em crescimento, uma situação comum às regiões Norte e Nordeste, em virtude das suas peculiaridades edafoclimáticas.

Quanto a presença da IGA entre as regiões da Bahia, pode-se verificar que houve efeito significativo da interação entre todas as regiões consideradas para avaliação de IPP e o IEP12. Com base nos dados obtidos com as estimativas de correlação genética para IPP e IEP 12, observou-se uma forte interação genótipo ambiente entre os gradientes ambientais estudados. Dados que corroboram com os reportados por Ambrosini *et al.* (2016), onde o autor evidenciou a presença da IGA em sistemas de criação de novilhas da raça Nelore criadas sob diferentes gradientes ambientais na região Nordeste do Brasil. Semelhante a Silveira *et al.* (2014), que realizou uma avaliação entre três diferentes regiões do estado de Mato Grosso do Sul.

Esses resultados são supostamente decorrem das diferenças marcantes nas condições ambientais e de manejo entre as regiões, tendo em vista que a extensão territorial e diversidade geoclimática do estado. Sendo que, de acordo com estudo realizado por Carvalho (2017), considerando a diversidade existente entre os ambientes e manejos adotados para a criação de bovinos de corte no estado, permitiu classificá-lo em três regiões distintas (R1, R2, R3), levando em consideração os fatores supracitados. Assim, os resultados obtidos corroboram com os dados reportados na literatura e sinalizam a presença da interação genótipo ambiente sobre as características reprodutivas de IPP e IEP12 entre as regiões do estado da Bahia, indicando que diferentes grupos genéticos atuam na determinação fenotípica das características reprodutivas em fêmeas nelores bovinas criadas no estado.

Conclusão



Portanto conclui-se que as progênes de animais geneticamente superiores em uma região podem não apresentar os mesmos resultados, se suas progênes forem criadas em regiões diferentes. Assim, a classificação dos reprodutores com base no desempenho de suas progênes varia de uma região para outra, e desse modo, a escolha correta dos reprodutores para fazendas específicas é um fator fundamental para maximização do progresso genético.

Referências

- ABCN – Associação Brasileira dos Criadores da raça Nelore. 2016. Disponível em: <https://www.abcz.org.br/noticias/noticia/24825/joaozito-andrade-eternizado-nos-eventos-da-bahia>. Acesso em: 07 mar. 2022.
- ALENCAR, Maurício Mello de; MASCIOLI, Arthur dos Santos; FREITAS, Alfredo Ribeiro de. Evidências de interação genótipo x ambiente sobre características de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 489-495, 2005.
- AMBROSINI, Diego Pagung et al. Interações genótipo x ambiente em características reprodutivas de bovinos Nelore no nordeste do Brasil. **Sanidade e produção animal tropical**, v. 48, n. 7, pág. 1401-1407, 2016.
- AZEVÊDO, Danielle Maria Machado Ribeiro et al. Parâmetros genéticos e fenotípicos do desempenho reprodutivo de fêmeas Chianina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 982-987, 2006a.
- AZEVÊDO, Danielle Maria Machado Ribeiro et al. Desempenho reprodutivo de vacas Nelore no Norte e Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 988-996, 2006b.
- CARVALHO, Caio Victor Damasceno. Avaliação genético quantitativa e genômica para características reprodutivas de bovinos da raça Nelore. 2017.
- FRIDRICH, A. B. et al. Interação genótipo x ambiente e estimativas de parâmetros genéticos dos pesos aos 205 e 365 dias de idade de bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 917-925, 2008.
- IBGE. **Cartograma - Bovinos da Bahia por Efetivo do rebanho**. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?=&t=destaques>.
- PEROTTO, Daniel; ABRAHÃO, José Jorge dos Santos; KROETZ, Inácio Afonso. Intervalo de partos de fêmeas bovinas Nelore, Guzará x Nelore, Red Angus x Nelore, Marchigiana x Nelore e Simental x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 733-741, jan. 2006a.
- PEROTTO, Daniel et al. Estudos de características reprodutivas de animais da raça Canchim, criados a pasto, no estado do Paraná, Brasil. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 2, 2006b.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

MISZTAL, Ignacy et al. Manual for BLUPF90 family of programs. **Athens: University of Georgia**, v. 199, 2014.

SILVEIRA, M. V. et al. Interação genótipo x ambiente sobre características produtivas e reprodutivas de fêmeas Nelore. **Archivos de zootecnia**, v. 63, n. 241, p. 223-226, 2014.

VARGAS, ADF et al. Parâmetros genéticos e tendência para características reprodutivas de vacas Nelore. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 41, 2004.



AValiação DA INTERAÇÃO GENÓTIPO-AMBIENTE SOBRE AS CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM MACHOS DA RAÇA NELORE CRIADOS NA BAHIA

EVALUATION OF GENOTYPE-ENVIRONMENT INTERACTION ON REPRODUCTIVE CHARACTERISTICS IN NELORE MALE BREED IN BAHIA

Taiane Nogueira dos SANTOS^{1*}; Hélen Larissa da Cruz OLIVEIRA²; Caio Victor Damasceno
CARVALHO³; Thereza Cristina Calmon de BITTENCOURT⁴

¹Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB – Barra – Bahia –
Brasil.

²Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB – Barra – Bahia –
Brasil.

³Centro Multidisciplinar de Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia – UFOB – Barra – Bahia –
Brasil.

⁴Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia – UFBA – Salvador – Bahia
– Brasil.

*E-mail: taianedossantos19@gmail.com

Abstract

The scrotal circumference is the most used reproductive trait as a selection criterion, mainly because it is easy to measure and helps in the choice of superior animals. The objective of this study was to evaluate the presence of genotype-environment interaction on reproductive traits in Nelore males with scrotal circumference index at 365 and 450 years of age (PE365 and PE450) raised in three different regions of the state of Bahia. To estimate the indices, data restrictions were performed using the SAS 9.2 software. The means and standard deviations found for the characteristic were 20.91 ± 2.76 cm (at 12 months) and 25.21 ± 3.96 cm (at 14 months). The genetic correlation is significant for PE365 between regions R1 x R2, R1 x R3 and R2 x R3, respectively, 0.023, 0.022 and 0.015, and for PE450 between R1 x R3 with a correlation of 0.04, indicating that the trait provides support for selection driving.

Keywords: Zebu; Scrotal perimeter; Creation system; Genetical enhancement.

Introdução

A pecuária bovina nacional está sustentada na utilização dos zebuínos, animais das raças pertencentes a subespécie *Bos taurus indicus* (CEZAR *et al.*, 2005). Na região Nordeste o rebanho bovino tem crescido consecutivamente nos últimos anos, com destaque para o estado da Bahia por sua grande extensão territorial e pelo efetivo total de bovinos, ocupando a 7ª posição no cenário nacional (IBGE, 2021).

A Bahia apresenta regiões com imensa diversidade climática e ambiental, sendo apontado por Carvalho *et al.* (2017) como um dos fatores, que podem influenciar na expressão das características de interesse econômico para os bovinos da raça Nelore, e por essa razão, é



importante a avaliação genética dos animais criados nas diferentes regiões, visto que, para a maioria das características de importância econômica dos bovinos, a expressão sofre interação genótipo-ambiente (IGA).

O conhecimento do efeito da IGA é fundamental durante o processo de seleção, pois reprodutores com progênes de alta performance em uma região, ou sistema de produção, podem não expressar esse potencial genético quando submetidos em ambientes diferentes, sendo assim, os parâmetros de escolha são modificados de acordo com as condições ambientais (ALENCAR *et al.*, 2005). Fridrich *et al.* (2008), apontam que as características ambientais dentro de sistema de produção animal podem levar à alteração na classificação das progênes de reprodutores e matrizes criados entre as distintas microrregiões de um estado ou entre estados da mesma região.

Vários estudos avaliaram a presença da IGA entre diversas regiões do país, porém ainda há escassez de trabalhos que avaliem a IGA no estado da Bahia. Por esse motivo, objetivou avaliar a presença da interação genótipo-ambiente sobre as características reprodutivas dos machos da raça Nelore criados em três diferentes regiões do estado da Bahia, e com isso, colaborar com as discussões sobre os efeitos da IGA.

Material e métodos

Os dados utilizados foram cedidos pelo Programa de Melhoramento genético de zebuínos (PMGZ), conduzido pela Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ). Sendo constituído por informações de bovinos da raça Nelore, criados em diferentes microrregiões do estado da Bahia.

O software SAS 9.2 (SAS 9.2 SAS Institute, Cary, NC, USA), um programa que permite realizar restrições no banco de dados, foi utilizado para adicionar novas variáveis aos grupos de contemporâneos, sendo mês, ano e estações de nascimento. A primeira estação de nascimento teve início nas águas, a segunda no período água-seca, a terceira no período seco e a quarta no período de transição seca-água.

As características estudadas foram os perímetros escrotais ajustados para as idades de 365 e 450 dias (PE365 e PE450). No preparo dos dados os valores que excederam a média ± 3 cm (centímetro) desvios-padrão foram deletados do sistema. Após as restrições do banco de dados, restaram 15.153 registros de PE365 e 12.831 de PE450, de um total de 52.757 registros inicialmente.



Para determinar os ambientes de criação e posterior avaliação da presença da IGA, foram necessários a obtenção de dados geoclimáticos de diferentes municípios baianos por meio da plataforma online do INMET (Instituto Nacional de Meteorologia), sendo as informações coletadas para as seguintes variáveis climáticas: temperatura, umidade, pressão e precipitação, geográfica, e a altitude das cidades em relação ao nível do mar.

Após a coleta dos dados, os mesmos foram organizados em planilhas do Excel para o cálculo das médias e desvio-padrão e posterior análise multivariada para a determinação da similaridade geoclimática entre os municípios e posterior caracterização dos ambientes de criação pelo método de Cluster (análise de agrupamento), com formação de três grupos homogêneos, nomeados de região 1, 2 e 3.

A presença da IGA é determinada quando a correlação genética entre as características forem inferior a 0,80 (ROBERTSON, 1959). Na obtenção das correlações genéticas, considerou o efeito aleatório do próprio animal e o efeito fixo do grupo de contemporâneo, sendo utilizados os softwares GIBBS2F90 e POSTGIBBSF90 para análise, utilizando-se 1000000 ciclos e burn-in de 100000 (MISZTAL *et al.*, 2014).

Resultados e discussão

As médias e desvios-padrão para PE365 e PE450 são apresentados na Tabela 1. Esses valores são semelhantes aos relatados por Mamede et al. (2012) que avaliaram animais da raça Nelore em prova de ganho em peso a pasto, os quais foram de $20,89 \pm 1,80$ cm (aos 12 meses) e $24,88 \pm 2,42$ cm (aos 14 meses). Os mesmos autores indicaram que as médias encontradas são superiores às descritas para outras regiões do Brasil. Fato percebido no trabalho de Gressler et al. (2014), pois ao realizarem um estudo sobre fatores ambientais, estimaram os parâmetros genéticos da circunferência escrotal na raça Nelore e constataram valores médios de PE365 e PE455, respectivamente, 19,37 cm e 22,87 cm.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos dados para PE365 e PE450.

<i>Característica</i>	<i>Número</i>	<i>de</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-padrão</i>
	<i>animais</i>		<i>(cm)</i>	<i>(cm)</i>
PE365	15.153		20,91	2,76
PE450	12.831		25,21	3,96



Para os valores médios descritos, Carvalho *et al.* (2020) reportaram valores superiores aos encontrados neste estudo. No entanto, o valor médio do PE365 é superior aos dados ajustados relatados na literatura (GRESSLER *et al.*, 2014). O resultado do PE450, equivale ao descrito por Araújo *et al.* (2010), que obtiveram 20,8 cm. Parte dessa variação observada no presente estudo, pode ser atribuída ao fato das medidas avaliadas não serem ajustadas aos 365 e 450 dias, sendo apenas filtrados aos 280 a 400 e 401 a 500 dias de idade, respectivamente. De modo geral, as médias obtidas aos 365 (20,91 cm) e 450 (25,21 cm) dias de idade neste trabalho, estão dentro dos valores limites descritos nas literaturas consultadas para a raça Nelore.

Os resultados das análises de correlação genética para PE365 e PE450 nas diferentes regiões de criação e o nível de significância das correlações, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Correlação genética para perímetro escrotal padronizado aos 365 e 450 dias de idade.

	<i>PE365</i>			<i>PE450</i>		
	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>	<i>R1</i>	<i>R2</i>	<i>R3</i>
<i>R1</i>	1,000	0,023	0,022	1,000	-	0,04
<i>R2</i>		1,000	0,015			1,00
<i>R3</i>			1,000			

As correlações genéticas para PE365 nas regiões R1 x R2, R1 x R3 e R2 x R3, respectivamente, 0,023, 0,022 e 0,015 são fracas, indicando que os animais não expressam a característica de PE365 da mesma forma nas regiões, por conterem diferentes grupos gênicos que atuam sobre a característica de acordo com a região de criação.

Para PE450 a correlação entre a R1 e R3 é fraca, demonstrando que diferentes grupamentos genéticos estão atuando sobre a mesma característica nos diferentes ambientes de criação. No PE450 não foi possível realizar a avaliação da região 2 devido ao baixo número de observações nesta região, pois os grupos de contemporâneos com dois animais foram excluídos do banco de dados. Assim, com essa nova restrição dos dados, o banco de dados avaliado contou com cerca de 9.000 animais.

As correlações fracas se devem as condições de manejo nas fazendas e o ambiente de criação nas regiões, sendo necessário que os programas de melhoramento genético considerem em suas análises os efeitos da IGA, uma vez que, ao selecionarem animais criados em diferentes regiões, as suas progênes podem não apresentar o mesmo desempenho.



Conclusão

Os índices de PE365 e PE450 indicam subsídio para condução de seleção dos bovinos da raça Nelore. As correlações genéticas entre PE365 e PE450 nas regiões avaliadas são significativas, indicando que se deve adotar cautela ao selecionar animais para a reprodução, onde suas progênes não serão criadas sobre as mesmas condições de ambiente que seu pai foi selecionado.

Agradecimentos

Agradecimento à Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ) pela concessão dos dados utilizados neste trabalho.

Referências

ALENCAR, M. M. et al. Evidências de interação genótipo x ambiente sobre características de crescimento em bovinos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 489-495, 2005.

ARAÚJO, R.O. et al. Índice perímetro escrotal-peso ajustado aos 365 e 450 dias de idade para bovinos Nelore. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 02, n. 53, p. 171-176, 2010.

CARVALHO, C.V.D. **Avaliação genético quantitativa e genômica para características reprodutivas de bovinos da raça Nelore**. 2017.

CARVALHO, C.V.D. et al. Avaliação genética do índice perímetro escrotal/peso corporal em bovinos da raça Nelore criados na Bahia, Brasil. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 3, n. 3, p. 242-248, 2020.

CEZAR, I.M. et al. Sistemas de Produção de Gado de Corte no Brasil: Uma Descrição com Ênfase no Regime Alimentar e no Abate. Campo Grande, MS: **Embrapa Gado de Corte**, p. 40, 2005.

FRIDRICH, A. B. et al. Interação genótipo x ambiente e estimativas de parâmetros genéticos dos pesos aos 205 e 365 dias de idade de bovinos Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 917-925, 2008.

GRESSLER, S.L.; GRESSLER, M.G.M.; BERGMANN, J. A. G.. Fatores ambientes e estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal na raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 986-994, 2014.

IBGE. **Bovinos da Bahia por Efetivo do rebanho**. 2021.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

MISZTAL, I. et al. Manual for BLUPF90 family of programs. Athens: University of Georgia. Manual for BLUPF90 family of programs. Georgia: Athens: **University of Georgia**. 2014.

ROBERTSON, A. The sampling variance of genetic correlation coefficient. **Biometrics**, v. 15, p.469- 485, 1959.



AVALIAÇÃO DA VITRIFICAÇÃO DIRETA EM CRIOTUBOS NA FORMAÇÃO DE CRIOBANCO DE TECIDO SOMÁTICO DE JAGUATIRICA

EVALUATION OF DIRECT VITRIFICATION IN CRYOTUBES IN THE FORMATION OF CRYOBANK OF SOMATIC TISSUE OF OCELOT

João Vitor da Silva VIANA¹; Leonardo Vitorino Costa de AQUINO¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Matheus Barbosa do NASCIMENTO¹; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Fabiano Rocha Prazeres JÚNIOR²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Programa de Residência Profissional da Área da Saúde em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

*joaovitorvianajr@gmail.com

Resumo

Os criobancos de pele representam ferramentas importantes para a conservação da representação genética máxima de uma população, principalmente daquelas com certo grau de ameaça de extinção, como a jaguatirica. Um passo relevante para o estabelecimento adequado desses bancos é avaliar os efeitos da criopreservação sobre a conservação da pele. Nós avaliamos os efeitos da vitrificação direta em criotubos na preservação da pele derivada de jaguatirica. Para tanto, a pele auricular foi vitrificada usando meio essencial mínimo modificado por Dulbecco com 3,0 M de dimetilsulfóxido, 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino. Tecidos não criopreservados foram usados como controle. Todos os tecidos foram analisados quanto às suas características morfométricas por histologia convencional e análise morfológica/funcional pela capacidade celular durante o cultivo. Embora uma redução na espessura da epiderme tenha sido observada entre os tecidos não criopreservados e criopreservados, nenhuma diferença foi observada para a espessura da derme ($301,51 \pm 38,55 \mu\text{m}$ vs $300,76 \pm 65,18 \mu\text{m}$) e viabilidade das células após cultivo *in vitro* dos tecidos. Portanto, a técnica de vitrificação direta em criotubos demonstrou adequada na criopreservação de amostras somáticas de jaguatirica.

Palavras-chave: felídeos silvestres, criopreservação, recursos somáticos.

Abstract

Skin cryobanks represent important tools for the conservation of the maximum genetic representation of a population, especially those with a certain degree of threat of extinction, such as the ocelot. A relevant step towards the proper establishment of these banks is to assess the effects of cryopreservation on skin conservation. We evaluated the effects of direct vitrification in cryovials on the preservation of ocelot-derived skin. For this, the auricular skin was vitrified using Dulbecco's modified minimal essential medium with 3.0 M dimethyl sulfoxide, 0.25 M sucrose and 10% fetal bovine serum. Non-cryopreserved tissues were used as a control. All tissues were analyzed for their morphometric characteristics by conventional histology and morphological/functional analysis by cellular capacity during culture. Although a reduction in epidermis thickness was observed between non-cryopreserved and cryopreserved tissues, no difference was observed for dermis thickness ($301.51 \pm 38.55 \mu\text{m}$ vs $300.76 \pm 65.18 \mu\text{m}$) and cell



viability after *in vitro* tissue culture. Therefore, the technique of direct vitrification in cryotubes proved to be adequate in the cryopreservation of somatic samples of ocelots.

Keywords: wild felids, cryopreservation, somatic resources.

Introdução

A fauna brasileira é constituída por uma diversidade de felídeos silvestres (REIS *et al.*, 2006), dentre os quais se insere a jaguatirica, a qual tem um papel ecológico essencial nos habitats que pertencem, atuando na manutenção dos ecossistemas por meio do controle de suas presas (RODRÍGUEZ-SOTO *et al.*, 2013). Esta espécie, embora de ampla distribuição e de alta densidade quando comparada a outras espécies de felídeos silvestres (BORON *et al.*, 2018), tem tido sua população reduzida em algumas regiões brasileiras, sendo classificada nacionalmente e internacionalmente como uma espécie menos preocupante à extinção.

Nesse contexto, a conservação de amostras somáticas, especialmente recuperadas da pele, tem atuado como uma alternativa interessante para a manutenção da biodiversidade (PRAXEDES *et al.*, 2019). A primeira etapa para uso destas amostras consiste no estabelecimento de bancos de tecidos somáticos. Em estudos em mamíferos silvestres, a vitrificação tem sido a técnica com menos geração de danos celulares nos tecidos conservados, quando comparada a congelação lenta. Contudo, a vitrificação possui variações em seus métodos, os quais têm o propósito de reduzir ainda mais os danos gerados pela criopreservação, bem como a redução da quantidade de solução de criopreservação (SHU *et al.*, 2015).

Dentre essas técnicas, a vitrificação direta em criotubos (VDC), ganha destaque sob alguns aspectos, como a menor possibilidade de contaminação (MASRAT-UN-NISA *et al.*, 2022). Assim, o objetivo foi avaliar os efeitos da VDC sobre a conservação de tecidos somáticos de jaguatirica.

Material e métodos

Para o estudo, biópsias da região auricular (1,0–2,0 cm²) foram obtidas a partir de uma jaguatirica recuperada no município de Mossoró, RN, e avaliada no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (ICMBio no. 75137-1). As amostras foram tricotomizadas, fragmentadas (9,0 mm³) e distribuídas para o grupo controle (não criopreservado) e criopreservadas por vitrificação direta em criotubos (VDC).

Para a criopreservação, fragmentos foram alocadas em criotubos utilizando como solução de criopreservação meio essencial mínimo modificado por Dullbecco (DMEM) acrescido de 3,0



M de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,25 M de sacarose (SAC) e 10% de soro feral bovino (SFB). Após duas semanas, as amostras foram aquecidas e analisadas quanto às suas características histológicas, bem como viabilidade celular após cultivo *in vitro*.

Para realização das análises histológicas, amostras foram fixadas, desidratadas, diafanizadas e impregnadas com parafina, para obtenção de lâminas histológicas, após secção tecidual (5 µm). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para mensuração da espessura da epiderme e derme, e quantificação de número de fibroblastos (PRAXEDES *et al.*, 2019). Para tanto, foram produzidas 20 imagens em aumento de 40×, que foram analisadas com auxílio do Image J.

Para realização do cultivo *in vitro*, amostras foram cultivadas a 38,5°C e 5% de CO₂ em DMEM acrescido de 10% de SFB e 2% de antibiótico/antimicóticos. Após obtenção das células, estas foram analisadas quanto à integridade da membrana celular, onde as células foram expostas ao corante azul de tripan a 0,4%. Células viáveis não tiveram penetração do corante, enquanto inviáveis foram coradas em azul.

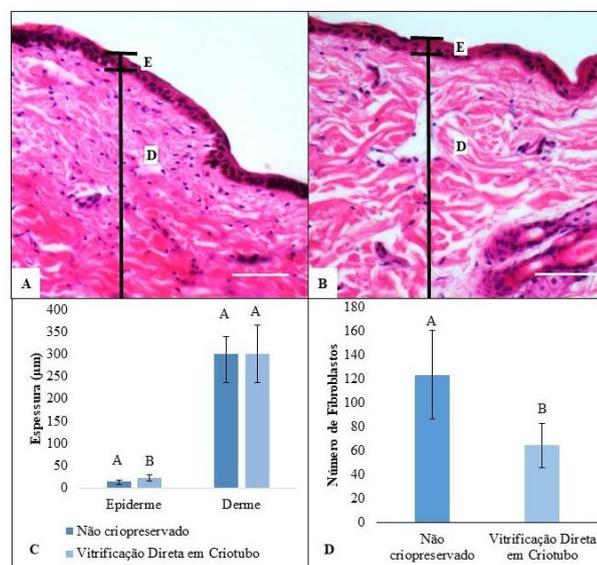
Finalmente, os dados foram expressos como média ± erro padrão, sendo analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo teste de Levene. Os dados da viabilidade não demonstraram distribuição normal e foram transformados em arco-seno e, juntamente, com os dados da morfologia com distribuição normal, foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste de Turkey. Os dados de quantificação de fibroblastos foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

Resultados e discussão

Após a criopreservação, por meio da avaliação morfológica das amostras (Fig. 1A e 1B), foi observada uma espessura superior da epiderme criopreservada por VDC ($22,50 \pm 6,85 \mu\text{m}$) em contraste com o grupo não criopreservado ($14,57 \pm 3,27 \mu\text{m}$, Fig. 1C). Tal variação em sua espessura pode ser ocasionada devido formação de cristais de gelo, ocasionando expansão da camada (RABIN, 2021).

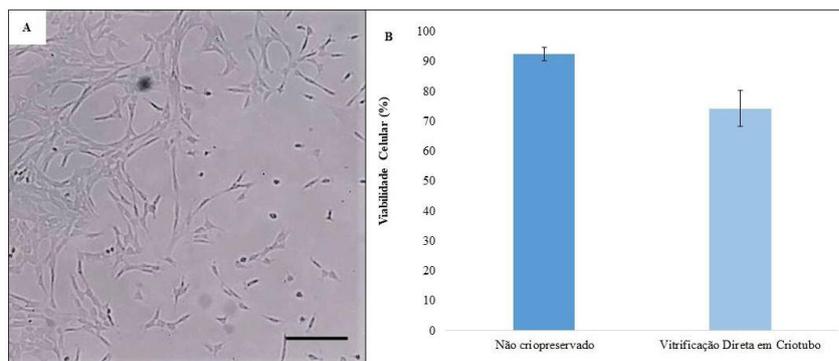
No que se refere à derme, houve uma manutenção de sua espessura, apresentando valores semelhantes entre os grupos ($301,51 \pm 38,55 \mu\text{m}$, *vs* $300,76 \pm 65,18 \mu\text{m}$, Fig. 1C). Tal resultado contrasta com o observado por PRAXEDES *et al.* (2019) com onça-pintada, onde a VDC ocasionou redução na espessura da derme, demonstrando a relação espécie-específica dos protocolos de criopreservação. Adicionalmente, a VDC promoveu uma redução na quantidade de fibroblastos de $123,3 \pm 37,13$ para $64,5 \pm 18,46$ (Fig. 1).

Figura 1 - Análise morfológica usando coloração de hematoxilina-eosina da pele auricular de jaguatirica antes e após criopreservação por VDC. **(A)** Grupo não criopreservado. **(B)** Grupo vitrificado por vitrificação direta em eriotubo. **(C)** Espessura da epiderme e derme. **(D)** Quantificação de fibroblastos. E indica a epiderme e D a derme. ^{AB}: $P < 0,05$.



Quanto às análises dessas células durante o cultivo *in vitro*, estas apresentaram uma alta viabilidade tanto dos tecidos não criopreservados ($92,5\% \pm 2,3$) quanto dos tecidos criopreservados por VDC ($74,3\% \pm 6,1$) (Fig. 2). Mesmo com a redução em sua quantidade na região dérmica, ao submeter-se ao cultivo *in vitro*, a qualidade da viabilidade celular manteve-se, o que demonstra que o método de conservação promoveu a manutenção da membrana celular, assim como a utilização das condições de cultivo podem ter auxiliado na obtenção de células viáveis.

Figura 2 - Cultivo *in vitro* de tecido somático de jaguatirica. **(A)** Células durante cultivo *in vitro*. **(B)** Viabilidade das células derivadas de tecidos não criopreservados e criopreservados. $P > 0,05$.





Conclusão

Os resultados demonstram que a VDC promoveu a manutenção de parâmetros importantes da arquitetura tecidual e promoveu a recuperação de células viáveis. Outras técnicas de criopreservação devem ser estudadas, de modo que se possa otimizar protocolos mais viáveis e com maior conservação da amostra, visando o uso destas células em clonagem reprodutiva.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

BORON, V.; XOFIS, P.; LINK, A.; PAYAN, E.; TZANOPOULOS, J. Conserving predators across agricultural landscapes in Colombia: habitat use and space partitioning by jaguars, pumas, ocelots and jaguarundis. **Oryx**, p. 1–10, 2018.

MASRAT-UN-NISA, MALIK, A.A.; SOFI, K.A.; KHATUN, A.; YOUSUF, N. Recent advancements in vitrification cryodevices for gamete and gonadal tissue. **CryoLetters**, v.43, p. 129–139, 2022.

PRAXEDES, É.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, M.B.; BORGES, A.A.; SANTOS, M.V.O.; SILVA, H.V.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus,1758). **Cryobiology**, v. 88, p. 15–22, 2019.

REIS, N.R., PERACCHI, A.L, PEDRO, W.A.; LIMA, J.P. Sobre os mamíferos do Brasil, Sobre os mamíferos do Brasil. **Mamíferos do Brasil**, p. 17–26, 2006.

RODRÍGUEZ-SOTO, C.; MONROY-VILCHIS, O.; ZARCO-GONZÁLEZ, M.M. Corridors for jaguar (*Panthera onca*) in Mexico: Conservation strategies. **Journal for Nature Conservation**, v. 21, p. 438–443, 2013.

SHU, Z.; GAO, D.; PU, L.L. Update on cryopreservation of adipose tissue and adipose-derived stem cells. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 42, p. 209–218, 2015.



AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE MANEJO NUTRICIONAIS E REPRODUTIVOS EM BOVINOS COMO CRITÉRIO DE ASSOCIAÇÃO AO BEM-ESTAR DOS ANIMAIS

EVALUATION OF NUTRITIONAL AND REPRODUCTIVE MANAGEMENT PRACTICES IN CATTLE AS A CRITERION FOR ASSOCIATION WITH ANIMAL WELFARE

Yndyra Nayan Teixeira carvalho CASTELO BRANCO^{1*}; Samira Santos ARAÚJO¹; Raquel Mesquita LIMA¹; Alana Samira da Silva SOUSA¹; Leonardo Bernardes Taverny de OLIVEIRA¹; Marlon de Araújo CASTELO BRANCO²; Deyse Nayra Mascarenhas COSTA³; Isolda Márcia Rocha do NASCIMENTO³

¹Curso de Zootecnia, Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha – MA, Brasil.

²Centro de Controle de Zoonoses, Teresina – PI, Brasil.

³Curso Técnico em agropecuária, Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, Brasil.

*E-mail: yndyra.nayan@ufma.br

Abstract

The objective was to verify the impacts of nutritional and reproductive management as a criterion for association with well-being of cattle, within the productive structure of farms. Dichotomous questionnaires were developed aiming to verify nutritional and reproductive management, relating such themes to animal welfare. Questionnaires were applied in 30 farms within dairy beef cattle, all in the region of Chapadinha city, from december 2021 to april 2022. It was found that attention given to the production system goes beyond care with animal, nutrition or reproduction, involving too concern for behavior, adaptation, physiological state and welfare of the animals. The nutritional and reproductive managements used in the properties under study, in general, reflect the basic needs of the producers. But, even so, the demand for technical monitoring, better reproductive responses, animal environment, balanced diets that meet the ideal consumption of animals, adequacy of management to animal behavior is necessary to obtain better responses in association with animal welfare.

Keywords: beef cattle, animal handling, five freedoms, reproduction, nutrition.

Introdução

O bem-estar de reprodutores e matrizes pode ser prejudicado por problemas relacionados à nutrição, ao ambiente, à saúde, ao comportamento e aos estados emocionais, interferindo nos índices reprodutivos, como: precocidade sexual, ciclicidade reprodutiva, expressão de estro, ovulações, produção de espermatozoides viáveis etc. Pois o bem-estar envolve aspectos relacionados ao próprio animal, às condições ambientais às quais ele está submetido e a combinação desses fatores. De tal forma, que oferecer a melhor dieta e tratamento sanitário não garante que o



animal tenha alto grau de bem-estar. Por esse motivo, ao avaliar o bem-estar dos animais é indispensável que se dê atenção a todos esses domínios CARVALHAL; COSTA, 2018).

Tendo esses aspectos como ponto de partida, são fundamentais a sensibilização e o envolvimento de todo o setor produtivo com relação às questões éticas, e econômicas. Mas ainda assim o crescente progresso do setor corre paralelo com manejos reprodutivos intensos que interferem na eficiência e no desempenho reprodutivo reduzindo o bem-estar animal (CARVALHAL; COSTA, 2018). Objetivou-se verificar os impactos dos manejos nutricional e reprodutivo como critério de associação ao bem-estar em rebanho bovino, dentro da estrutura produtiva das fazendas.

Material e métodos

A abordagem do estudo foi pelo método hipotético dedutivo, desenvolvido por Popper (1935), que parte da percepção de uma lacuna nos conhecimentos da qual se formulam hipóteses e testam a predição da ocorrência de fenômenos abrangidos pela hipótese (MARCONI; LAKATOS, 2006). Utilizou-se a estatística descritiva como instrumentos para identificar informações sobre as variáveis pesquisadas, permitindo cruzar as respostas e verificar hipóteses. Como o objetivo de responder à questão do problema, foi desenvolvido questionário dicotômico voltado para os manejos nutricional e reprodutivo associando tais temas ao Bem-Estar animal. Os questionários foram aplicados em 30 propriedades rurais voltado à produção de leite e de carne bovina na cidade de Chapadinha, no período de dezembro 2021 a abril de 2022.

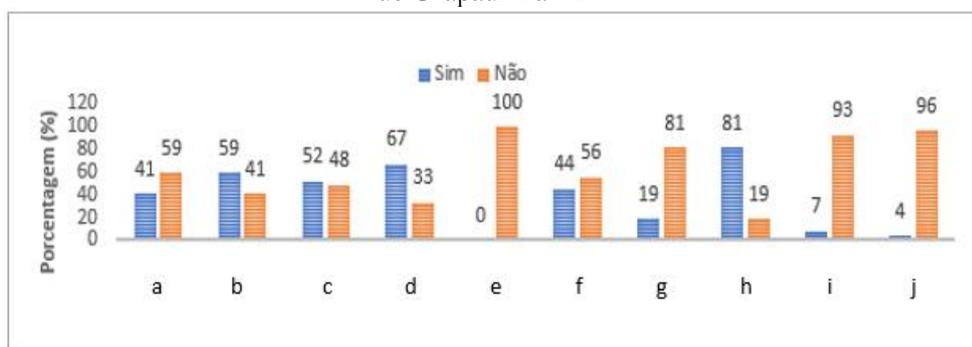
Foi utilizado o programa Microsoft Excel (2013) para organização e planificação dos dados encontrados no desenvolvimento do trabalho, favorecendo a posterior interpretação de todas as questões, as quais foram tabulados e analisados por meio da análise de correspondência.

Resultados e discussão

A Figura 1 mostra a percentagem que evidencia as características da região de chapadinha, onde 59% dos proprietários entrevistados não faziam uso de corretivos ou fertilizantes, cerca de 59% faziam o uso de diversificação de pastagem, e 52% dos proprietários afirmaram fazer consorciação de gramíneas com leguminosas. De acordo com Paulino *et al.* (2004) a produção animal a pasto é o resultado da eficiência de três métodos: produção de forragem, consumo de forragem pelos animais e conversão da forragem em produto animal (desempenho animal), e

quando há o desbalanceamento de algum desses três métodos, há perdas no rendimento da produção animal.

Figura 1 - Procedimentos referente ao manejo nutricional realizados nas propriedades rurais no município de Chapadinha-MA.



a. São empregados os corretivos e fertilizantes na formação ou recuperação das pastagens? **b.** Utiliza a diversificação de pastagem, reduzindo os riscos do monocultivo? **c.** Utiliza a consorciação de gramíneas com leguminosas, visando maior sustentabilidade do sistema? **d.** Efetua o controle de plantas invasoras nas pastagens? **e.** Utiliza a integração lavoura-pecuária (ILP) como alternativa para implantação e reforma de pastagem? **f.** Existem pastagens com sinais de degradação e elevados índices de plantas invasoras? **g.** A propriedade possui um mapa atualizado descrevendo o uso do solo? **h.** Os estoques de suplementos alimentares são suficientes e adequados? **i.** Registra e atualiza os cadastros de todos os insumos utilizados na alimentação do rebanho? **j.** Recebe orientação de um técnico especializado para formular os suplementos?

Fonte: Autoria própria.

Levando isso em consideração, observou-se que na região há carência quanto ao uso de tecnologias para a produção de forragem, o que reflete diretamente nas condições nutricionais do rebanho. Como a região se encontra no bioma cerrado, as condições ambientais e a carência de investimentos em tecnologias voltadas para o solo e pastagem, prejudicam o crescimento de plantas forrageiras.

No período de estiagem, seca e frio, as pastagens passam a ter menos nutrientes que no período de chuva, por isso, a seriedade da estocagem de suplementos alimentares para que nesse momento o rebanho continue a ganhar peso. Cerca de 81% dos produtores entrevistados afirmaram que os estoques de suplementos alimentares são suficientes para os seus animais ao longo do ano, em contrapartida 96% relataram que não recebem orientação de um técnico especializado para formular esses suplementos o que gera uma questão, pois, uma dieta

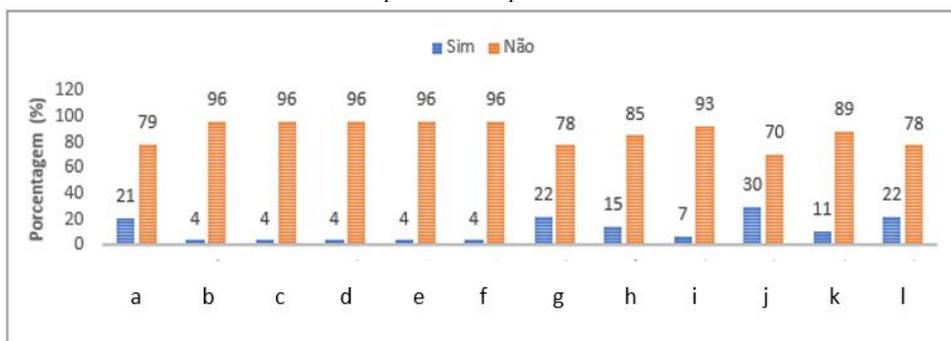


desbalanceada não atende as exigências nutricionais do animal e piora a sua capacidade produtiva, refletindo sobre competência econômica (VALADARES FILHO *et al.*, 2009).

Das propriedades estudadas, 67% realizavam o controle das plantas invasoras, e 56% das propriedades não possuíam sinais de degradação e nem índice de plantas invasoras. A presença nas pastagens de plantas daninhas se constitui num dos principais fatores responsáveis pela baixa produtividade das pastagens brasileiras. Tanto estas plantas invasoras quanto as forrageiras requerem, para o seu desenvolvimento, água, luz e nutrientes e geralmente se adaptam ao seu ambiente por meio de uma seleção natural. Além disso, as plantas daninhas diminuem a qualidade de forragem, como também, ao serem consumidas, podem causar intoxicação acarretando a morbidade ou mesmo a mortalidade de animais (PEREIRA *et al.*, 2006).

De acordo com a Figura 2 apenas 21% das propriedades rurais realizavam estação de monta, cerca de 96% não faziam uso de biotecnologias reprodutivas como inseminação artificial, transferência de embrião ou produção in vitro de embriões, essa porcentagem ainda se repete nas perguntas: “utiliza de algum protocolo hormonal para aumentar os índices reprodutivos dos animais?” , “as fêmeas são destinadas a reprodução precocemente?”, e “é feito a coleta de sêmen por eletroejaculação?”, o que evidenciou que na região não há práticas habituais de manejo reprodutivo, ou mesmo o emprego de biotécnicas reprodutivas.

Figura 2 - Procedimentos referente ao manejo reprodutivo realizados nas propriedades rurais no município de Chapadinha-MA.



a. É realizado estação de monta? **b.** Utiliza-se alguma biotecnologia reprodutiva? **c.** Utiliza-se algum protocolo hormonal para aumentar os índices produtivos dos animais? **d.** Utiliza-se algum protocolo hormonal para aumentar os índices reprodutivos dos animais? **e.** As fêmeas são destinadas a reprodução precocemente? **f.** É feito coleta de sêmen por eletroejaculação? **g.** Alguma fêmea abortou nos últimos 12 meses? **h.** Foi observado animais com febre? **i.** Alguma fêmea apresentou metrite ou retenção de placenta nos últimos 12 meses? **j.** Tem sido observado repetição de estro? **k.**



Alguma fêmea apresentou mastite nos últimos 12 meses? 1. Alguma fêmea apresentou hipocalcemia nos últimos 12 meses?

Fonte: Autoria própria.

Segundo Marques *et al.* (2014), no manejo reprodutivo é necessário que haja a compreensão e experiência do produtor e do técnico sobre a ambiência, o tipo do animal, a sanidade e a disposição de recursos naturais, técnicos e financeiros indispensáveis para introdução do manejo objetivando uma boa eficiência reprodutiva.

Ao analisar os dados obtidos e a experiência em campo naquela região, observou-se que a maior parte são de pequenas propriedades que não possuem suporte técnico instrucional sobre manejo reprodutivo, sendo esse fator ocasionado por ausência de informação ou ainda, falta de meios técnicos e financeiros, o que reflete diretamente na eficiência do rebanho que, geralmente, apresentam histórico de apenas um parto por vaca a cada 24 meses ou mais.

Neste estudo, em 78% das propriedades rurais não se observou aborto, em 85% não se verificou a ocorrência de febre nos animais. E por fim se tratando de metrite ou retenção de placenta, 93% falaram que não houve caso em suas propriedades.

Conclusão

Os manejos nutricionais e reprodutivo empregados nas propriedades em estudo, de modo geral refletem as carências básicas dos produtores. Mas, ainda assim a demanda por acompanhamento técnico, melhores repostas reprodutivas, ambientação animal, dietas balanceadas e que atendam o consumo ideal dos animais, adequação dos manejos ao comportamento animal se faz necessária para que se obtenha melhores respostas em associação ao bem-estar animal.

Referências

CARVALHAL, M.V.L.; OLIVEIRA COSTA, F.O. Principais aspectos sobre bem-estar de touros mantidos em centrais de coleta de sêmen. **Revista Brasileira de Zootecias**, 19(2): 249-264. 2018.

VALADARES FILHO, S.C.; CHIZZOTTI, M.L.; PAULINO, P.V.R. Exigências nutricionais de bovinos de corte no Brasil: desafios **Revista Ceres**, 2009, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

MARQUES JUNIOR, A.P.; XAVIER, P.R.; LEÃO, R.A.C. Manejo reprodutivo de bovinos: potencialidade e desafios. **Acta Vet. bras.**, 2014.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

PAULINO, M.F.; FIGUEIREDO, D.M.; MORAES, E.H.B.K. et al. Suplementação de Bovinos em pastagens: uma visão sistêmica. *In*: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 4., 2004, Viçosa, MG. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004.

PEREIRA, J. R.; SILVA, W. **Controle de plantas daninhas em pastagens**. Embrapa gado de leite. 2006.



AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS EM FUNÇÃO DA SEGUNDA COLOSTRAGEM DE BEZERROS DA RAÇA GIROLANDO

EVALUATION OF PHYSIOLOGICAL BIOMARKERS AS A FUNCTION OF THE SECOND COLOSTRAGE IN GIROLANDO CALVES

Hugo Andrey Santos dos SANTOS^{1*}; Allana Lais Alves LIMA¹; Dayane Bentes dos SANTOS¹; Deyvid de Menezes MELO¹; Luciara Celi Chaves DAHER¹; Waldjânio de Oliveira MELO²; Bruno Moura MONTEIRO¹; Rinaldo Batista VIANA¹

¹Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Paragominas, Pará, Brasil;

*E-mail: hugosaantos03@gmail.com

Abstract

Rearing calves is a key step in dairy farming, due to its economic importance and high genetic and technological investments. However, it is necessary to supply colostrum, a food rich in antibodies and cells, to prevent these animals from remaining susceptible to infectious agents and causing diseases, since such diseases can be diagnosed through changes in vital parameters. Thus, the objective was to evaluate the influence of second colostrum on physiological biomarkers of calves raised in the amazon humid tropic. The study was carried out on a farm located in the municipality of Paragominas, from December 2021 to July 2022, where 80 calves, 28 males and 52 females, of the Girolando breed were evaluated. For the calves' colostrum, a volume of 10% of body weight was supplied at birth, within two hours after birth, with a Brix degree equal to 25%. When this percentage was not reached, the thawed colostrum was enriched with artificial colostrum powder, as determined by the manufacturer, until reaching a brix equal to 25%. To obtain heart rate and respiratory rate biomarkers, a Göteç phonendoscope (Hauptner & herberholz) was used and, to measure rectal temperature, a digital veterinary thermometer (Incoterm 6900.02). No significant differences were observed in treatment effects and in the interaction between time and treatment. Offering a second dose of colostrum at 5% of body weight does not change physiological parameters.

Keywords: Animal health; diagnosis; physiological parameters

Introdução

A criação de bezerros é uma etapa primordial na pecuária leiteira, tanto no aspecto econômico, vinculado a futura produção, sendo de carne ou leite, quanto ao alto investimento genético e tecnológico (COELHO, 2009). Mediante a esta etapa, está a importância do colostro para a sobrevivência desses animais, para que cresçam fortes e saudáveis, devido este alimento apresentar elevadas quantidades de anticorpos e células, bem como outros componentes nutricionais e imunológicos importantes para o desenvolvimento do neonato (GUERRA *et al.*, 2017; CAIXETA; CARMO, 2020).



O colostro é fundamental no sucesso da transferência da imunidade passiva aos bezerros, já que após o nascimento, estão susceptíveis a agentes infecciosos presentes no ambiente. A falha nessa transferência, pode ocasionar inúmeras enfermidades, como doenças respiratórias e diarreia, causando aumento nas taxas de mortalidade e morbidade (WEILLER *et al.*, 2019).

As enfermidades podem ser diagnosticadas por meio de modificações nos parâmetros vitais analisados nos neonatos (SILVA *et al.*, 2016).

Dessa forma, objetivou-se com esse estudo, avaliar a influência da segunda colostragem nos biomarcadores fisiológicos: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR) de bezerros da raça Girolando criados no trópico úmido amazônico.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Paragominas, pertencente à mesorregião do sudeste paraense, no período de dezembro de 2021 a julho de 2022.

Foram avaliados 80 bezerros, da raça Girolando, sendo 28 machos e 52 fêmeas, elegidos em delineamento inteiramente casualizado, alocados em dois grupos: 1) manejo convencional (n = 40, 1 colostragem) e 2) dupla colostragem (n = 40), mantidos em bezerreiro tipo tropical. Somente foram incluídos no estudo, bezerros nascidos de partos eutócicos monitorados, separados de suas mães, tempestivamente, após o nascimento. Os animais eram acompanhados diariamente, desde o nascimento até os 60 dias de idade.

Os animais eram colostrados utilizando-se colostro descongelado em banho-maria, à temperatura de 35 a 40 °C, com grau Brix igual a 25 °Bx, ofertados em um volume de 10% do peso corpóreo nas primeiras duas horas pós-nascimento. Para a segunda colostragem, 5% do peso corpóreo em colostro eram ofertados aos bezerros em até no máximo 18 horas após o nascimento. Quando o colostro descongelado não atingia esse percentual, era enriquecido com colostro artificial em pó, consoante a determinação do fabricante até atingir 25 °Bx. Para o fornecimento do colostro eram utilizadas mamadeiras, e quando o animal não ingeria espontaneamente, era utilizado uma sonda esofágica para auxiliar na total ingestão.

Os animais foram avaliados desde imediatamente ao nascimento até os 60 dias de idade, determinando-se os biomarcadores fisiológicos: frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) por meio de auscultação realizada com fonendoscópio de Götez (Hauptner & Herberholz) e aferição da temperatura retal (TR) por meio de termômetro digital veterinário (Incoterm 6900.02). Durante



os 60 dias, foram determinados dias específicos para avaliação dos biomarcadores fisiológicos, sendo estes ao nascimento (0h), 24h (1d), 48h (2d), 7d, 15d, 30d, 45d e 60d. As medidas foram analisadas utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). As variáveis-resposta contínuas foram submetidas a testes de normalidade de resíduos e homogeneidade de variâncias por meio do Guided Data Analysis Solutions do SAS. A comparação entre as médias dos grupos foi realizada por meio do teste de médias Tukey, mediante o comando Least Square Means (LSMeans) do SAS, utilizando o nível de 5% de significância para todos os testes realizados.

Resultados e Discussão

Diante das informações obtidas dos biomarcadores fisiológicos realizados nos bezerros, tanto no manejo convencional quanto na dupla colostragem, não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) nos efeitos de tratamento e da interação entre tempo e tratamento (**Tabela 1**).

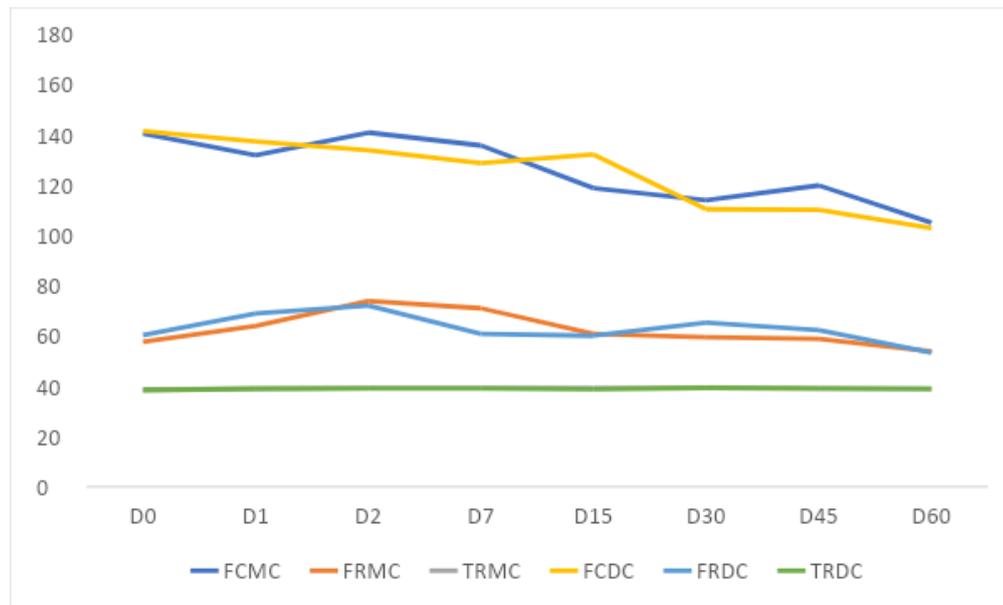
Tabela 1 - Dados clínicos de dois grupos de bezerros conforme os protocolos de colostragem.

Variáveis	Manejo Convencional		Dupla Colostragem		Tempo	P value	
	Média	EPM	Média	EPM		Tratamento	Tem * Trat
Número de animais	32		28				
Frequência cardíaca, bpm	125,73	1,76	124,50	1,81	< 0,0001	0,59	0,20
Frequência respiratória, mrpm	62,34	1,34	62,93	1,61	< 0,0001	0,77	0,56
Temperatura retal, °C	39,04	0,04	38,91	0,06	< 0,0001	0,05	0,37

Os valores dos biomarcadores fisiológicos obtidos apresentaram semelhanças em relação aos dados obtidos por Freitas *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2016) que também avaliaram tais parâmetros em bezerros após o nascimento.



Figura 1 - Dados clínicos de bezerros Girolando em dois protocolos de colostragem.



FCMC: frequência cardíaca no manejo convencional; FRMC: frequência respiratória no manejo convencional; TRMC: temperatura retal no manejo convencional; FCDC: frequência cardíaca na dupla colostragem; FRDC: frequência respiratória na dupla colostragem; TRDC: temperatura retal na dupla colostragem

A administração de uma segunda dose de colostro se deu através da hipótese de que os animais colostrados duas vezes absorvem mais os constituintes do colostro, conseqüentemente respondem melhor em seu desenvolvimento e futuro desempenho, porém como está demonstrado na figura 1, os resultados não apresentaram diferenças relevantes neste estudo. Avaliações realizadas por meio de biomarcadores fisiológicos têm importância diante das alterações que os mesmos podem causar no desenvolvimento funcional dos bezerros, e até mesmo inferir em possíveis diagnósticos de doenças (PICCIONE *et al.*, 2010).

O estresse térmico é considerado um fator que pode prejudicar os resultados dos parâmetros fisiológicos nos animais, principalmente na raça Girolando (MAIA, 2019), e por conta das condições edafoclimáticas presentes na região Amazônica, isso pode também tender nas mudanças nos valores dos parâmetros analisados. Apesar disso, não foi observado tais modificações, mesmo que no local de realização do estudo constantemente ocorriam períodos de altas temperaturas seguidas de momentos chuvosos, os quais podem prejudicar a saúde dos animais.



Conclusão

Ofertar ao bezerro uma segunda colostragem no valor de 5% do peso vivo dos bezerras, não alteram os parâmetros fisiológicos dos animais.

Referências

CAIXETA, D. G.; CARMO, J. P. CRIAÇÃO DE BEZERROS NEONATOS: manejo e bem estar. **Scientia Generalis**, v.1, n.3, p.92-103, 2020.

COELHO, S.G. Desafio na criação e saúde de bezerras. CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 2009, Belo Horizonte. **Anais...**, Belo Horizonte: [s.n.] 2009.p.1-16, 2009.

FREITAS, B. B.; MENEGUEL, A. L.; SILVA, E.; BREDA, J. C.; LENOCH, R.; ... & BIANCHI, I. Parâmetros fisiológicos e desempenho de ganho de peso em bezerras mestiças leiteiras durante período de aleitamento. **In** Mostra Científica e Tecnológica, Instituto Federal do Ceará, Campus Araquari. Ceará, 2015.

GUERRA, G. A.; DORNELES, E. M. S.; SOUZA, F. N.; CORTEZ, A.; BATISTA, C. F.; COELHO, S. G.; ... HEINEMANN, M. B. Neonatologia em bezerras: a importância do colostro. **R. Educ. contin. Med. Vet. Zoot.**, 32-41, 2017.

MAIA, G. G. **Efeito do estresse térmico em parâmetros fisiológicos e reprodutivos em animais girolando de valores genéticos distintos para termotolerância.** 2019, 58 p. Dissertação de Mestrado (Clínica e Reprodução Animal). Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, 2019.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; PENNISI, P.; GIANNETTO, C.; COSTA, A.; & CAOLA, G. Monitoring of physiological and blood parameters during perinatal and neonatal period in calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 62, 1-12, 2010.

SILVA, B. T.; HENKLEIN, A.; DE SOUSA MARQUES, R.; DE OLIVEIRA, P. L.; LEITE, S. B. P.; FONTES, S. M.; GOMES, V. Vital parameters of Holstein calves from birth to weaning. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.38, n.3, p. 299-304, 2016.

WEILLER, M. A. A.; RABASSA, V. R.; CORREA, M. N.; & DEL PINO, F. A. B. Aspectos relacionados à oferta de colostro na imunidade e saúde de bezerras leiteiras. **Science And Animal Health**, v.7n.2, p.80-104, 2019.



AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES INTRACELULARES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE ONÇAS-PARDAS

EVALUATION OF DIFFERENT INTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS IN THE CRYOPRESERVATION OF PUMA-DERIVED FIBROBLASTS

Luanna Lorena Vieira RODRIGUES^{1*}; Yasmin Beatriz França MOURA¹, João Vitor da Silva VIANA¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Lhara Ricarlany Medeiros de OLIVEIRA¹; Herlon Victor Rodrigues SILVA²; Alessandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

*luannavieira59@gmail.com

Resumo

A redução de onças-pardas associada à sua importância ecológica tem resultado no desenvolvimento de bancos de fibroblastos. Em geral, o sucesso destes bancos e sua aplicação na transferência nuclear de célula somática depende da escolha das condições de criopreservação destas células. Portanto, o objetivo foi avaliar dois tipos de crioprotetores intracelulares (dimetilsulfóxido, DMSO e etilenoglicol, EG) na criopreservação de fibroblastos derivados da pele auricular de três onças-pardas. Para tanto, fibroblastos em terceira passagem foram criopreservados por congelamento lento em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (grupo DMSO) ou 10% de EG (grupo EG). Todas as células foram avaliadas para viabilidade usando azul de tripan e atividade metabólica usando o ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e avaliados por ANOVA seguida de teste Tukey. Nenhuma diferença foi observada para a viabilidade em células criopreservadas com 10% de DMSO ($86,7\% \pm 4,8$) e 10% de EG ($83,5\% \pm 8,6$). Além disso, nenhuma diferença foi observada para as células criopreservadas quanto à atividade metabólica com 10% de DMSO ($99,8\% \pm 0,07$) e 10% de EG ($94,4\% \pm 4,5$). Em conclusão, ambos os crioprotetores intracelulares (DMSO e EG) foram eficientes na criopreservação de fibroblastos de onças-pardas. Esses resultados representam informações importantes na formação de bancos de recursos somáticos para a espécie.

Palavras-chave: Felídeos silvestres, criobancos, congelamento lento.

Abstract

The reduction of pumas associated with their ecological importance has resulted in the development of fibroblast banks. In general, the success of these banks and their application in somatic cell nuclear transfer depends on the choice of cryopreservation conditions for these cells. Therefore, the objective was to evaluate two types of intracellular cryoprotectants (dimethylsulfoxide, DMSO and ethylene glycol, EG) in the cryopreservation of fibroblasts derived from the auricular skin of three puma. For this purpose, third passage fibroblasts were cryopreserved by slow freezing in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum and 10% DMSO (DMSO group) or 10% EG (EG group). All cells were evaluated for viability using trypan blue and metabolic activity using the 3-4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Data were expressed as mean \pm standard error and evaluated by ANOVA followed by Tukey test. No difference was observed for viability in cells cryopreserved with 10% DMSO ($86.7\% \pm 4.8$) and 10% EG ($83.5\% \pm 8.6$). Furthermore, no



difference was observed for cryopreserved cells regarding metabolic activity with 10% DMSO ($99.8\% \pm 0.07$) and 10% EG ($94.4\% \pm 4.5$). In conclusion, both intracellular cryoprotectants (DMSO and EG) were efficient in the cryopreservation of puma fibroblasts. These results represent important information in the formation of somatic resource banks for the species.

Keywords: Wild felids, cryobanks, slow freezing.

Introdução

A onça-parda (*Puma concolor*) é um grande felídeo que ocorre em grande parte das Américas. Esta espécie tem uma distribuição geográfica muito ampla e tolera uma maior variedade de tipos de clima do que as onças-pintadas, por exemplo (ÁVILA-NÁJERA *et al.*, 2018). Essa espécie é listada como de menor preocupação pela IUCN (NIELSEN *et al.*, 2015) embora não ocorram mais em algumas regiões onde antes eram comuns (NOWELL; JACKSON, 1996), como em parte dos Estados Unidos e algumas áreas da América do Sul, principalmente no bioma Caatinga. Por essa razão, a formação de biobancos para esta espécie é fundamental.

Entre os bancos de células que podem ser empregados, visando o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, têm-se os bancos de células somáticas. Esses bancos quando adequadamente estabelecidos podem ser empregados na clonagem por transferência nuclear de células somáticas (MOULAVI *et al.*, 2017) e na indução de células à pluripotência (VERMA *et al.*, 2013). Dentre os fatores que podem garantir uma maior eficiência da criopreservação está a escolha dos crioprotetores intracelulares (ARANTES *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Portanto, o objetivo foi avaliar dois tipos de crioprotetores intracelulares (dimetilsulfóxido, DMSO e etilenoglicol, EG) na criopreservação de fibroblastos derivados da pele auricular de onças-pardas.

Material e métodos

Para o presente estudo, três onças-pardas adultas fêmeas pertencentes à zoológicos de Fortaleza (Ceará, Brasil) foram anestesiadas com 0,04 mg/kg de cloridrato de dexmedetomidina, por via intramuscular, e com auxílio de zarabatana, para a realização das biópsias de pele (1,0–2,0 cm²). Após a recuperação dos tecidos e transporte por 3 h a 4 °C em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos e antimicóticos, tecidos foram cultivados (5% CO₂ e 38,5 °C) para a obtenção de fibroblastos.



As células em terceira passagem foram criopreservadas por congelação lenta, conforme Oliveira et al. (2021), em DMEM contendo 10% de SFB e 10% de DMSO (grupo DMSO) ou 10% de EG (grupo EG). Brevemente, células foram ressuspensas em uma concentração final de $1,0 \times 10^5$ células/mL em solução de criopreservação. As células permaneceram em contato com a solução de criopreservação por 15 min a 4 °C. Em seguida, a suspensão celular foi armazenada em criotubos, e os mesmos transferidos para o recipiente de congelação (Mr. Frosty-Thermo Scientific Nalgene), o qual foi mantido em um freezer -80 °C, a fim de alcançar uma taxa de resfriamento de 1 °C/min por 12 h. Após esse período, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após duas semanas, as amostras foram descongeladas e analisadas para viabilidade usando azul de tripan e atividade metabólica usando o ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Para a análise da viabilidade das células foi realizada a coloração por azul de tripan, onde a taxa de sobrevivência foi calculada como a razão entre o número de células vivas e o número total de células $\times 100$. Para a análise metabólica, células foram cultivadas em placas de 12 poços. Após 5 dias, a solução de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio] (MTT) foi adicionada e as placas incubadas. Posteriormente, a solução foi removida e 1,0 mL de DMSO foi adicionado sob agitação lenta para solubilização dos cristais de MTT. Após a dissolução total dos cristais, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro a 595 nm.

Finalmente, os dados foram expressos como média \pm erro padrão e avaliados por ANOVA seguida de teste Tukey, usando o software Graphpad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA).

Resultados e discussão

Após criopreservação e cultivo *in vitro* (Fig. 1), nenhuma diferença foi observada para a viabilidade em células criopreservadas com 10% de DMSO ($86,7\% \pm 4,8$) e 10% de EG ($83,5\% \pm 8,6$, Fig 2). Este ensaio mostrou que as soluções crioprotetoras utilizadas promoveram a manutenção da membrana celular. Taxas semelhantes já foram observadas em células criopreservadas de outros felídeos silvestres, como tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*, 98,5%) (LIU et al., 2010), tigre de bengala (*Panthera tigris tigris*, 97,6%) (GUAN et al., 2010) e onça-pintada (*Panthera onca*, 87,6% a 91,2%, SILVA et al., 2021).

Figura 1- Cultivo de fibroblastos derivados de amostras da pele auricular de pumas. Células após criopreservação em DMEM contendo 10% de SFB e (A) 10% de DMSO e (B) 10% de EG. Barra de escala: 100 μ m, ampliação: 40 \times .

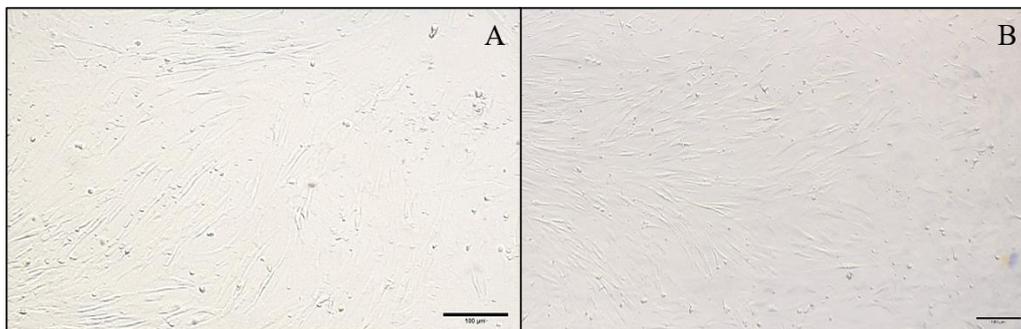
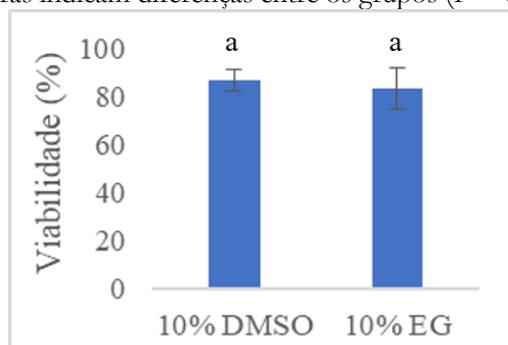


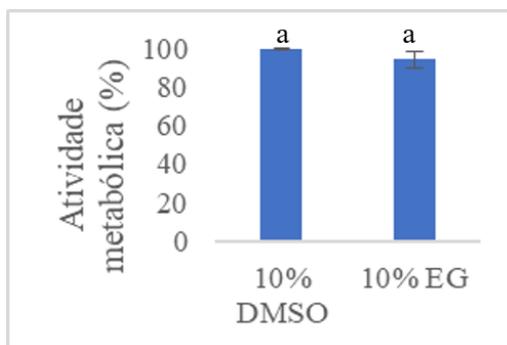
Figura 2 - Efeito da criopreservação sobre a viabilidade de fibroblastos derivados da pele auricular de pumas após a descongelação. ^{ab} letras indicam diferenças entre os grupos ($P > 0,05$).



Além disso, nenhuma diferença foi observada para as células criopreservadas quanto à atividade metabólica com 10% de DMSO ($99,8\% \pm 0,07$) e 10% de EG ($94,4\% \pm 4,5$, Fig. 3). Nossos resultados são semelhantes aos observados em células somáticas de outro grande felídeo silvestre. Em onça-pintada, Oliveira *et al.* (2021), relataram taxas acima de 70% após o ensaio de MTT em células desses animais. Ainda, Silva *et al.* (2021) obtiveram taxas de atividade metabólica acima de 90%, utilizando o mesmo ensaio, em fibroblastos da mesma espécie cultivados até a terceira passagem.



Figura 3 - Efeito da criopreservação sobre a atividade metabólica de fibroblastos derivados de pumas após a descongelação. ^{ab} letras indicam diferenças entre os grupos ($P > 0,05$).



Conclusão

Ambos os crioprotetores intracelulares (DMSO e EG) foram eficientes na criopreservação de fibroblastos de onças-pardas. Esses resultados representam informações importantes na formação de bancos de recursos somáticos para a espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ecopoint Parque Ecológico e ao Zoológico Municipal Sargento Prata (Fortaleza, Ceará) pelo acesso e manejo das onças-pardas, ao Comitê de Ética de Uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

ARANTES, L.G.; TONELLI, G.S.S.S.; MARTINS, C.F.; BÁO, S.N. Cellular characterization and effects of cryoprotectant solutions on the viability of fibroblasts from three Brazilian wild cats. **Biopreservation and Biobanking**, v. 19, p. 11-18, 2021.

ÁVILA-NÁJERA, D.M.; PALOMARES, F.; CHÁVEZ, C.; TIGAR, B.; MENDOZA, G.D. Jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) diets in Quintana Roo, Mexico. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 41, p. 257-266, 2018.

SILVA, M.B.; PRAXEDES, É.A.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; NASCIMENTO, M.B.; SILVA, H.V.R.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Evaluation of the damage caused by *in vitro*



culture and cryopreservation to dermal fibroblasts derived from jaguars: An approach to conservation through biobanks. **ZooBiology**, v. 40(4), p. 288-296, 2021.

NIELSEN, C.; THOMPSON, D., KELLY, M.; LOPEZ-GONZALEZ, C.A. 2015. *Puma concolor*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T18868A97216466.

OLIVEIRA, L.R.M.; PRAXEDES, É.A.; SILVA, M.B.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20190314, 2021.

VERMA, R.; LIU, J.; HOLLAND, M.K.; TEMPLE-SMITH, P.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P.J. Nanog is an essential factor for induction of pluripotency in somatic cells from endangered felids. **BioResearch**, v. 2, p. 72-76, 2013.



AVALIAÇÃO DE DOIS PROTOCOLOS DE VITRIFICAÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR BOVINO

EVALUATION OF TWO VITRIFICATION PROTOCOLS FOR BOVINE TESTICULAR TISSUE CRYOPRESERVATION

Ariella de Oliveira AZEVEDO^{1*}; Rodrigo de Souza AMARAL¹

¹Laboratório de Morfofisiologia e Reprodução Animal – LaMoRA, Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM, Manaus, AM, Brasil.

*ariella.oliveira16@gmail.com

Abstract

Cryopreservation of gonadal tissues is a technique capable of preserving the reproductive potential of different species, maintaining their reproductive potential after death. Vitrification is an ultra-fast freezing technique, providing lower operating costs and easiness of execution. This study aimed to evaluate the effectiveness of two vitrification protocols in the cryopreservation of bovine testicular tissue. We utilized ten bovine testes from adult animals. Six fragments of 1-3mm³ from each testicular parenchyma were removed and separated into three experimental groups (Control, DMSO, and Glycerol). The fragments were skewered on fine 30G needles and immersed in equilibration and vitrification solutions. Then, the material was immersed in liquid nitrogen and stored for seven days until thawing and processing using traditional histology techniques. The macroscopic analysis indicated retraction of the fragments in the groups cryopreserved with DMSO and glycerol, indicating possible damage resulting from the extracellular cryoprotective agent utilized in the protocols. The histomorphological analysis showed morphological alterations and a reduction in the diameter of the seminiferous tubules in both vitrified groups. Thus, the two vitrification techniques used in this study did not preserve the integrity of the tissue architecture of bovine testes, requiring further studies in the technique development.

Key words: reproduction, vitrification, freezing, testis, bovine.

Introdução

A criopreservação de tecidos gonadais é uma técnica capaz de preservar o potencial reprodutivo de diferentes espécies, de modo que animais selvagens em risco de extinção e animais com alto potencial reprodutivo de interesse econômico (COSTA *et al.*, 2011) mantenham o material genético viável mesmo após a morte. Os espermatozoides obtidos após a criopreservação podem formar um banco de gamoplasma e ser utilizado por biotécnicas da reprodução (COSTA *et al.*, 2011; ROLDAN & GOMENDIO, 2009), sendo capaz de preservar a fertilidade de animais pré-púberes falecidos (LIMA, 2017), de modo a se obter uma viabilidade indefinida de material genético.



Nesse cenário, a vitrificação se caracteriza como uma técnica de congelação ultrarrápida, utilizando soluções de crioprotetores mais concentradas e viscosas, de modo a não haver a formação de cristais de gelo (JARK *et al.*, 2016), além de garantir menor custo operacional quando comparado ao congelamento lento, maior eficiência e maior facilidade na realização dos procedimentos (LIMA, 2017).

A criopreservação de tecido testicular por vitrificação já foi descrita para algumas espécies domésticas e silvestres (JARK *et al.*, 2016; TRAVIS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2017; SILVA, 2020), entretanto, não há relatos de sua utilização em tecido testicular bovino. Os dados obtidos neste experimento auxiliarão no desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para a conservação de germoplasma de animais de alto valor genético.

Material e métodos

Metodologia experimental:

Para realização do estudo, foram utilizados dez testículos bovinos de animais adultos e com espermatogênese ativa obtidos em abatedouros inspecionados. De cada testículo foram retirados seis fragmentos de 1-3mm³ do parênquima testicular, sendo fracionados em meio Ham's F-10 e separados na forma de duplicata nos três grupos experimentais (Controle, DMSO e Glicerol). Os fragmentos do grupo Controle foram imediatamente fixados em solução de Davidson. Já os fragmentos dos demais grupos foram submetidos à técnica de vitrificação correspondente.

Vitrificação:

As duplicatas foram espetadas em agulhas finas de 30G. O material foi imerso em solução de equilíbrio contendo 1,4 mol/L de crioprotetor (DMSO ou Glicerol) e 0,25 mol/L de glucose em Ham's F-10, em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, o material foi transferido para solução de vitrificação contendo 2,8 mol/L de crioprotetor, 0,5 mol/L de glucose e 10% de SFB em meio Ham's F-10, em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, o material foi mergulhado imediatamente em nitrogênio líquido, com subsequente transferência para criotubos identificados e armazenagem em nitrogênio líquido.

Descongelamento:

Após sete dias, o material foi descongelado por 5 segundos em PBS mantido em banho-maria a 50°C, e em seguida por 3 banhos em temperatura ambiente de 5 minutos (0,5 mol/L de



glucose, 25% de SFB; 0,25 mol/L de glucose, 25% de SFB; e 25% de SFB; todos em meio Ham's F-10). Todos os fragmentos foram fixados em solução de Davidson.

Avaliação histológica e estatística:

Todos os fragmentos fixados foram submetidos a técnicas tradicionais de histologia, realizando-se a inclusão em parafina, com obtenção de cortes histológicos de 5µm de espessura, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina. As lâminas histológicas foram analisadas por microscopia óptica e fotografadas, onde a estrutura organizacional do parênquima testicular e a integridade das células foram avaliadas morfológicamente e comparadas entre os grupos experimentais. O diâmetro dos túbulos seminíferos foi obtido, comparando-se as médias dos diâmetros entre os grupos experimentais por meio do teste de Wilcoxon com correção de Bonferroni.

Resultados e discussão

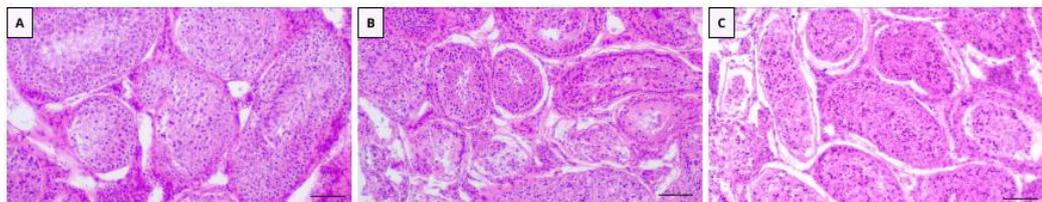
Avaliação macroscópica:

A análise macroscópica do tecido testicular após descongelamento indicou retração dos fragmentos nos grupos criopreservados com DMSO e glicerol, indicando um possível dano decorrente do agente crioprotetor extracelular utilizado, seja na substância utilizada (glucose), na concentração ou no tempo de exposição, levando a uma desidratação em excesso do material.

Avaliação histomorfológica:

A análise histomorfológica do tecido testicular indicou a presença de túbulos seminíferos com espermatogênese ativa e lúmen no grupo controle. Com relação à diferenciação celular e visualização do núcleo, pode-se depreender que os grupos DMSO e glicerol tiveram resultados menores quando comparados ao grupo controle (Figura 1).

Figura 1 – Fotomicrografia dos fragmentos testiculares de bovino do grupo controle (A) e vitrificados em DMSO (B) e glicerol (C). Barra = 100µm.



Quanto ao diâmetro dos túbulos seminíferos observados, pode-se notar uma diminuição significativa da média em ambos os grupos vitrificados quando comparados ao grupo controle ($p < 0,05$), sem diferença significativa entre os protocolos de vitrificação (Tabela 1). Notou-se, ainda, que o número total de túbulos seminíferos viáveis analisados diminuiu nos grupos vitrificados, indicando que os efeitos da retração dos fragmentos observados na análise macroscópica têm importância considerável (Tabela 1).

Tabela 1 - Média \pm DP dos diâmetros dos túbulos seminíferos avaliados e o número de túbulos viáveis em cada fragmento.

Grupos experimentais	Média \pm DP (n=10)	Total
Controle	174,58 \pm 5,95 ^a	52-156
DMSO	140,67 \pm 5,52 ^b	12-79
Glicerol	132,65 \pm 4,97 ^b	5-53

Letras diferentes – diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$)

O DMSO caracteriza-se como um solvente de baixo peso molecular (LIMA *et al.*, 2016), com rápida entrada na célula e consequente bloqueio da formação de cristais de gelo intracelulares. Por outro lado, o glicerol é um composto orgânico naturalmente presente na membrana celular usado para criopreservação de espermatozoides de diversas espécies (COMIZZOLI *et al.*, 2012) atuando na proteção das suas membranas celulares.

Yildiz *et al.* (2013), avaliando o uso de diferentes crioprotetores isolados (incluindo o DMSO e glicerol) em tecido testicular de camundongos neonatos, observou que o DMSO proporcionou maior proteção contra o congelamento e minimização de crioinjúrias aos componentes do tecido testicular, diferente do observado no presente estudo.

Estudos como o proposto por Lima *et al.* (2016) com relação a criopreservação de tecido testicular de gatos pré-púberes indicam que a associação de DMSO e glicerol seja benéfica devido aos baixos níveis de toxicidade do DMSO e da grande capacidade de proteção das membranas



plasmáticas do glicerol. Barbosa *et al.* (2011), por meio do congelamento lento da suspensão celular de fragmentos de tecido bovino adulto, demonstrou que o uso isolado de DMSO resultou em menor viabilidade celular quando comparado a associação de DMSO e propanodiol. Desta forma, é possível que a associação dos crioprotetores de forma combinada possa trazer melhores resultados no processo de vitrificação de tecido testicular bovino.

Conclusão

As duas técnicas de vitrificação empregadas neste estudo não foram capazes de preservar a integridade da arquitetura tecidual dos testículos de bovino, deste modo, novos estudos devem ser realizados testando adaptações no protocolo utilizado.

Agradecimento

Os autores agradecem à FAPEAM pela bolsa concedida.

Referências

BARBOSA, A. P. M.; MARTINS, C. F.; SERENO, J. R. B. Criopreservação de células espermatogênicas bovinas utilizando diferentes moléculas protetoras. **Arch. Zootec.**, v. 60, n. 230, p. 293-296, 2011.

COMIZZOLI, P.; SONGSASEN, N.; HAGEDORN, M.; WILDET, D. E. Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1666–1681, 2012.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F.; FRANCO, V. O.; REZENDE, L. O. F.; SERENO, J. R. B.; CAMPOS, H. C. F. Nascimento de bezerras normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte. **Ciência Rural**, v. 41, n. 5, p. 869-874, 2011.

JARK, P. C.; RAPOSO, T. M. M.; TRINDADE, A. B.; MACENTE, B. I.; ALVES, A. E.; APPARÍCIO, M. Criopreservação de tecidos gonadais para conservação da fertilidade em canídeos e felídeos: realidade ou promessa?. **Investigação**, v. 15, n. 9, p. 14-20, 2016.

LIMA, D. B. C.; SILVA, T. F. P.; MORAIS, G. B.; AQUINO-CORTEZ, A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; XAVIER JUNIOR, F. A. F.; VIANA, D. A.; SILVA, L. D. M. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 52, n. 2, p. 235-241, 2016.

LIMA, D. B. C.; SILVA, L. D. M. Cryopreservation of testicular tissue: an alternative to maintain the reproductive capacity in different animal species. **Ciência Rural**, v. 47, n. 11, 8 p., 2017.



ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M. Sperm and conservation. Sperm biology. **San Diego: Academic**, p. 539-564, 2009.

SILVA, A. M.; PEREIRA, A. F.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation. **Biopreservation and Biobanking**. v. 18, n. 3, p. 235-243, 2020.

TRAVIS, A.; MILAZZO, J. P.; PERDRIX, A.; METTON, C.; BIRONNEAU, B.; MACÉ, B.; RIVES, N. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. **Theriogenology**, v. 76, p. 981-990, 2011.

YILDIZ, C; MULLEN, B.; JARVI, K.; MCKERLIE, C.; LO, K. C. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal mouse testicular tissue. **Cryobiology**, v. 67, n. 1, p. 70-75, 2013.



AVALIAÇÃO DE SOLUÇÃO CRIOPROTETORA NA CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE JAGUATIRICA

EVALUATION OF CRYOPROTECTANT SOLUTION IN THE CONSERVATION OF OCELOT SOMATIC CELLS

Luanna Lorena Vieira RODRIGUES^{1*}; Karinne Yáscara Pereira AMORIM¹; Yasmin Beatriz França MOURA¹; João Vitor da Silva VIANA¹; Antonia Beatriz Mendonça PEREIRA¹; Samara Lima OLINDO¹; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró-RN, Brasil
*luannavieira59@gmail.com

Resumo

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é um felídeo de grande importância ecológica, econômica e científica. No entanto, a espécie está incluída na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas de acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) e estratégias de conservação têm sido desenvolvidas para a formação de biobancos a partir da criopreservação de células somáticas. Portanto, o objetivo foi avaliar uma solução de criopreservação em fibroblastos de jaguatirica, visando contribuir para a conservação da espécie. Para tanto, foram obtidas amostras somáticas derivadas da orelha de uma jaguatirica encontrada na cidade de Mossoró, a qual foi levada ao hospital veterinário da UFERSA, e em seguida as amostras foram cultivadas e criopreservadas em nitrogênio líquido em solução crioprotetora composta por 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), 0, 2 M de sacarose e 10% de soro fetal de bovino (SFB). Posteriormente, essas amostras foram descongeladas, cultivadas e submetidas ao ensaio de viabilidade por azul de tripan. Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão, quatro repetições foram consideradas para cada comparação e o software Graphpad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA) foi utilizado para a análise, considerando um valor de significância de $P < 0,05$. Assim, as células criopreservadas apresentaram viabilidade média de $89,7 \pm 3,0$, similar ao observado no grupo controle (não criopreservado) ($92,5 \pm 2,3$). Portanto, a solução crioprotetora avaliada foi eficiente na criopreservação de células somáticas de jaguatirica, promovendo a manutenção da viabilidade celular após aquecimento. Esses dados contribuem para a formação de um banco somático para as espécies em estudo.

Palavras-chave: Felídeos, jaguatirica, criopreservação, fibroblastos

Abstract

Leopardus pardalis, popularly known as ocelot, is a felid that has great ecological, economic and scientific importance. However, the species has been threatened with extinction and restricted its geographical distribution and is included in the Red List of Threatened Species according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN), listed as Least Concern. Considering this, conservation strategies have been developed to help maintain the genetic diversity of these animals, especially the formation of biobanks from the cryopreservation of somatic cells by slow freezing. In order for this tool to be used efficiently, intracellular and extracellular cryoprotectants are used. Therefore, the proposal aims to evaluate a cryopreservation solution in ocelot fibroblasts, aiming to contribute to the conservation of the species. Therefore, somatic samples were obtained from the apical auricle of an ocelot found in the city of Mossoró, from which it was taken to the veterinary hospital of UFERSA, and then the samples were cultured and cryopreserved in liquid



nitrogen in a cryoprotectant solution composed of 10% DMSO (dimethylsulfoxide), 0.2 M sucrose and 10% fetal bovine serum. Subsequently, these samples were thawed, cultured and submitted to the trypan blue viability assay. The data obtained were expressed as mean \pm standard error, four replications were considered for each comparison and the Graphpad InStat 3.06 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) was used for the analysis, considering a significance value of $P < 0.05$. Thus, cryopreserved cells showed an average of 89.7 ± 3.0 viability, which is similar to what was observed in the control group (non-cryopreserved) (92.5 ± 2.3). Therefore, the cryoprotectant solution evaluated was efficient in the cryopreservation of ocelot somatic cells, promoting the maintenance of cell viability after heating. These data contribute to the formation of a somatic bank for the species under study.

Keywords: Felids, ocelot, cryopreservation, fibroblasts.

Introdução

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é uma das espécies de mamíferos pertencente à família Felidae e à ordem Carnívora (OLIVEIRA; CASSARO, 1999). Essa espécie é classificada como pouco preocupante quanto ao risco de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), contudo, todos os felídeos silvestres estão sofrendo perda de habitat (PAVIOLO *et al.*, 2015). Além disso, a crescente expansão populacional humana tem ocasionado uma inevitável fragmentação dos biomas e isolamento de populações silvestres (DUEÑAS *et al.*, 2017). Devido esses fatores, estratégias de conservação têm sido desenvolvidas para auxiliar na manutenção da diversidade genética desses animais (SANDERSON *et al.*, 2002), especialmente a formação de biobancos a partir da criopreservação de células somáticas por congelamento lento (MACHADO *et al.*, 2016).

Para que essa ferramenta seja empregada de maneira eficiente são utilizados crioprotetores categorizados como penetrantes ou intracelulares, os quais são caracterizados por sua ligação com água e ação na redução do tamanho e na formação dos cristais de gelo (MORO *et al.*, 2015); e como não-penetrantes ou extracelulares, os quais são responsáveis por aumentar a osmolaridade do meio externo celular, reduzindo a formação dos cristais de gelo (LEÓN-QUINTO *et al.*, 2014). Nesse contexto, o uso do crioprotetor deve ser otimizado para a célula em estudo.

Portanto, avaliar a eficiência de soluções crioprotetoras demonstra qual mais se adequa a cada tipo celular e espécie. Para a criopreservação de células somáticas, é uma etapa fundamental para manter a conservação dos recursos somáticos da jaguatirica, sendo uma grande contribuição para a conservação da espécie.

Material e métodos



Para a coleta da pele derivada do pavilhão auricular apical, a jaguatirica foi previamente anestesiada com 0,08 mg/kg de cloridrato de dexmedetomidina (Dexdormitor®, Zoetis, São Paulo, SP, Brasil) por via intramuscular e monitorada durante todo o procedimento. As amostras de pele (1–2 cm²) foram obtidas com o auxílio de alicates de marcação animal. Após a coleta, as amostras foram lavadas em álcool 70% e transportadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de SFB e 2% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B, a 4° C em um período de 30 min.

No laboratório, os fragmentos foram tricotomizados e seccionados em 9,0 mm³. Em seguida, sob fluxo laminar, as amostras foram submetidas a lavagens em meios de acordo com a sequência: i) DMEM suplementado com 10% de SFB (denominado, DMEM+) e 10% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (denominado, DMEM₁₀); ii) álcool a 70% e iii) DMEM + acrescido de 2% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina B (denominado, DMEM₂). Finalmente, foi adicionado 10% de SFB em uma placa com DMEM₂, onde os explantes foram cultivados até a obtenção de células somáticas, as quais foram conservadas para uso nesta proposta de trabalho.

Para a congelação lenta, células foram ressuspensas em uma concentração final de 1,0 x 10⁵ células/mL em solução de criopreservação. As células permaneceram em contato com a solução de criopreservação testada (10% DMSO-SAC) por 15 min a 4 °C. Em seguida, a suspensão celular foi armazenada em criotubos identificados, e os mesmos transferidos para o recipiente de congelação (Mr. Frosty-Thermo Scientific Nalgene), o qual foi transferido para um freezer -80 °C, a fim de manter uma taxa de resfriamento de 1 °C/min por 12 h até alcançar -80 °C. Ao alcançar essa temperatura, as amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C).

Após duas semanas, as amostras foram descongeladas. Para tanto, criotubos foram mantidos a 25 °C por 1 min e imersos em banho-maria a 37 °C por 4 min. Para a remoção dos crioprotetores, as células foram lavadas com DMEM + 0,2 M de sacarose (SAC) e mantidas a 4 °C por 15 min. Finalmente, as células foram lavadas com DMEM e mantidas a 25 °C por 15 min e posteriormente cultivadas *in vitro* e submetidas à análise.

Para a análise da viabilidade celular foi realizado o método de coloração de azul de tripan para avaliação da integridade da membrana celular. A taxa de sobrevivência foi calculada como a razão entre o número de células vivas e o número total de células × 100. Os resultados foram

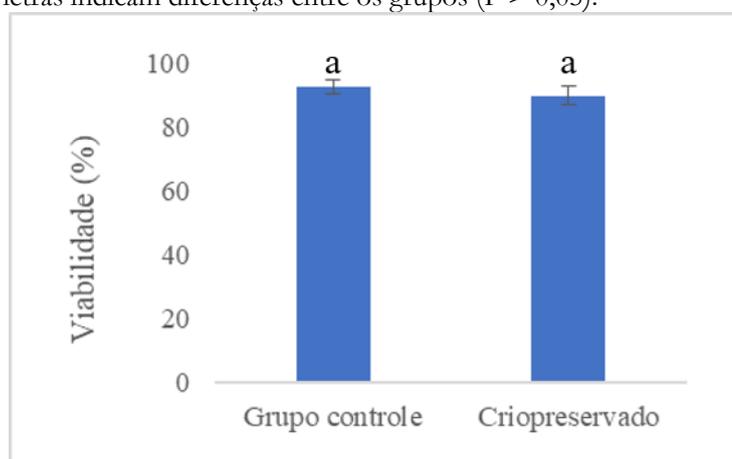


expressos como média \pm erro padrão. Para todos os experimentos, os dados foram avaliados usando o software Graphpad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA).

Resultados e discussão

Antes da criopreservação (grupo controle), as células apresentaram viabilidade pelo ensaio de azul de tripan de $92,5 \pm 2,3$. Quanto à taxa de viabilidade do grupo criopreservado, 10% DMSO-SAC, não foi observada diferença estatística quando comparada ao grupo controle ($P < 0,05$), o qual apresentou taxa de viabilidade de $89,7 \pm 3,0$ (Fig. 1).

Figura 1 - Efeito da criopreservação sobre a viabilidade de fibroblastos derivados da pele de jaguatirica após a descongelação. ^a letras indicam diferenças entre os grupos ($P > 0,05$).



Nossos dados corroboram com o que foi observado na criopreservação de células de lince-ibérico por León-Quinto *et al.* (2014), os quais utilizaram a combinação de 10% de DMSO com 35% de SFB e 0,2 M de sacarose células derivadas da pele e obtiveram resultados positivos, com taxas de viabilidade acima de 80%. Outros trabalhos já relataram a utilização de 10% de SFB em conjunto a 10% de DMSO para criopreservar células derivadas da pele de diferentes felídeos, como a onça-pintada (*Panthera onca*, OLIVEIRA *et al.*, 2021), gato-do-deserto (*Felis margarita*, MESTRE-CITRINOVITZ *et al.*, 2016), gato-marmorado (*Pardofelis marmorata*, GÓMEZ *et al.*, 2008), gato-leopardo (*Prionailurus bengalensis*, THONGPHAKDEE *et al.*, 2006), e gato-da-líbia (*Felis silvestris libica*, YIN *et al.*, 2006) obtendo taxas de viabilidade acima de 80% após a descongelação.

Conclusão



A solução crioprotetora avaliada foi eficiente na criopreservação de células somáticas de jaguatirica, promovendo a manutenção da viabilidade celular após o aquecimento. Portanto, esses dados contribuem para a formação de um banco somático para a espécie em estudo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ecopoint Parque Ecológico e ao Zoológico Municipal Sargento Prata (Fortaleza, Ceará) pelo acesso e manejo das onças-pardas, ao Comitê de Ética de Uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

DUEÑAS, A., ESCOBAR-LASSO, S., AGUILAR-RAYA, G., MENDOZA, E. Wild felid species richness affected by a corridor in the lacandona forest, mexico. **Biodiversity and Conservation**, v. 40, p. 115-120, 2017.

LEÓN-QUINTO, T.; SIMÓN, M.A.; CADENAS, R.; MARTÍNEZ, A.; SERNA, A. Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). **Cryobiology**, v. 68, p. 227-233, 2014.

MACHADO, L.C.; OLIVEIRA, V.C.; PARAVENTI, M.D.; CARDOSO, R.N.R.; MARTINS, D.S.; AMBRÓSIO, C.E. Maintenance of brazilian biodiversity by germplasm bank. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 62-66, 2016.

MESTRE-CITRINOVTZ, A.C.; SESTELO, A.J.; CEBALLOS, M.B.; BARAÑAO, J.L.; SARAGÜETA, P. Isolation of primary fibroblast culture from wildlife: the *Panthera onca* case to preserve a South American endangered species. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 116, p. 28.7.1-28.7.14, 2016.

MORO, L.N.; HIRIART, M.I.; BUEMO, C.; JARAZO, J.; SESTELO, A.; VERAGUAS, D.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, L.; SALAMONE, D.F. Cheetah interspecific SCNT followed by embryo aggregation improves in vitro development but not pluripotent gene expression. **Reproduction**, v. 150, p. 1-10, 2015.

OLIVEIRA, L.R.M.; PRAXEDES, É.A.; SILVA, M.B.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93, e20190314, 2021.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

PAVIOLO, A.; OLIVEIRA, T.; SCHIPPER, J.; BIANCHI, R.; PAYAN, E; CARVAJAL, S.V. *Leopardus pardalis* (errata version published in 2016) The IUCN Red List of Threatened Species 2015.

SANDERSON, W.; REDFORD, K.H.; CHETKIEWICZ, C.L.B.; MEDELLIN, R.A.; RABINOWITZ, A.R.; ROBINSON, J.G.; TABER, A.B. Planning to save a species: the jaguar as a model. **Conservation Biology**, v. 16, p. 58-72, 2002.



AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA CASCA DE *Citrus sinensis* DURANTE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

EVALUATION OF THE ESSENTIAL OIL FROM THE PEEL OF *Citrus sinensis* DURING THE *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES

Leonardo Vitorino Costa de AQUINO^{1*}; Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹; Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA¹; Tássio Lessa do NASCIMENTO²; Luciana Medeiros BERTINI²; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Alessandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Apodi, RN, Brasil.

*E-mail: leonardovt@live.com

Resumo

A otimização dos meios de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos representa uma etapa fundamental para o aumento da eficiência da produção *in vitro* de embriões. Uma estratégia interessante para atingir esse objetivo consiste no uso de substâncias naturais, tais como o óleo essencial de *Citrus sinensis* (OECS), e seu emprego depende da análise prévia de seus possíveis efeitos sobre as taxas de MIV. Portanto, nós avaliamos 10 e 50 µg/mL de OECS sobre as taxas de expansão das células do *cumulus*, primeiro corpúsculo polar (1CP) e metáfase II (MII) após a MIV por 24 h (38,5°C e 5% de CO₂) de oócitos bovinos. Um grupo na ausência de OECS foi usado como controle. Após dez repetições, células do *cumulus* de oócitos maturados com 10 µg/mL de OECS apresentaram expansão superior quando comparado aos oócitos na ausência de OECS e com 50 µg/mL de OECS. Além disso, 10 µg/mL de OECS também garantiu uma taxa superior da extrusão do 1CP quando comparado a 50 µg/mL de OECS, embora não tenha sido observado diferença na análise por MII. Esses resultados sugerem que 50 µg/mL de OECS apresenta um efeito deletério sobre as células do *cumulus*, sem afetar a competência meiótica dos oócitos bovinos. Em conclusão, 10 µg/mL de OECS pode ser empregado na MIV de oócitos bovinos, sem causar efeitos deletérios para células do *cumulus* e oócitos.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões, metáfase II, maturação nuclear.

Abstract

The optimization of *in vitro* maturation media (IVM) of bovine oocytes represents a fundamental step towards increasing the efficiency of *in vitro* embryo production. An interesting strategy to achieve this goal is the use of natural substances, such as essential oil of *Citrus sinensis* (EOCS), and its use depends on a previous analysis of its possible effects on IVM rates. Therefore, we evaluated 10 and 50 µg/mL EOCS on the expansion rates of *cumulus*, first polar body (1PB) and metaphase II (MII) cells after IVM for 24 h (38.5°C and 5% CO₂) from bovine oocytes. A group in the absence of EOCS was used as a control. After ten repetitions, *cumulus* cells from oocytes matured with 10 µg/mL of EOCS showed superior expansion when compared to oocytes in the absence of EOCS and with 50 µg/mL of EOCS. Furthermore, 10 µg/mL of EOCS also ensured a higher extrusion rate of 1PB when compared to 50 µg/mL of EOCS, although no difference was observed in the analysis by MII. These results suggest that 50 µg/mL of EOCS has a deleterious effect on *cumulus* cells, without affecting the meiotic competence of bovine oocytes. In conclusion, 10 µg/mL of



EOCS can be used in the IVM of bovine oocytes, without causing deleterious effects on *cumulus* cells and oocytes.

Keywords: In vitro embryo production, metaphase II, nuclear maturation.

Introdução

A casca de laranja (*Citrus sinensis*), visando a geração de novos coprodutos, torna-se uma opção alternativa quando a produção em larga deste produto resulta em impacto ambiental pela geração de resíduos sólidos (VIDAL, 2021). Dentre os coprodutos, têm-se o óleo essencial de *C. sinensis* (OECS), o qual sua atividade antioxidante tem sido observada por ensaios bioquímicos (FERRONATTO; ROSSI, 2018) e poderia ser empregada na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE).

Contudo, antes de seu emprego como antioxidante seja efetivado, é interessante observar os efeitos gerados pelo OECS nas taxas de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. Esta avaliação é importante, pois poderá auxiliar na compreensão dos efeitos ocasionados por essa substância, sejam essas deletérias ou na inibição à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Portanto, o objetivo foi avaliar efeito do OECS sobre as taxas de expansão das células do *cumulus*, primeiro corpúsculo polar (1CP) e metáfase II (MII) após a MIV de oócitos bovinos.

Material e métodos

Inicialmente, para a realização do experimento, foi realizada a colheita de cascas de laranja. Em seguida, a matéria-prima foi secada, triturada e encaminhada ao processo de hidrodestilação para a recuperação do óleo essencial, onde foi possível obter 2,9% de rendimento (% m/m; 0,84 gmL⁻¹ de densidade). Posteriormente, a identificação química por meio de cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (CG/EM) foi realizada, sendo identificados os componentes: D-limoneno (48,5%), α -terpineol (19,6%) e 11,2% de outros fitoquímicos.

Para a recuperação dos ovários, animais de abatedouro local foram transportados ao laboratório em NaCl (0,9% a 35–37°C). Em seguida, folículos ovarianos (2–8 mm) foram aspirados usando agulha e seringa (21G/5 mL) contendo meio de seleção oocitária (MSO; TCM199-HEPES com 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) (OLIVEIRA et al., 2022).

Após a recuperação oocitária, estruturas com três camadas completas de células do *cumulus* e citoplasma uniforme foram selecionados para a MIV. Oócitos foram divididos em três grupos: (i) sem OECS (grupo controle), (ii) 10 µg/mL de OECS e (iii) 50 µg/mL de OECS. Todos os oócitos foram maturados por 24 h, a 38,5°C e 5% CO₂ em meio MSO acrescido de 20 mg/mL FSH/LH e os diferentes componentes de acordo com os grupos experimentais.

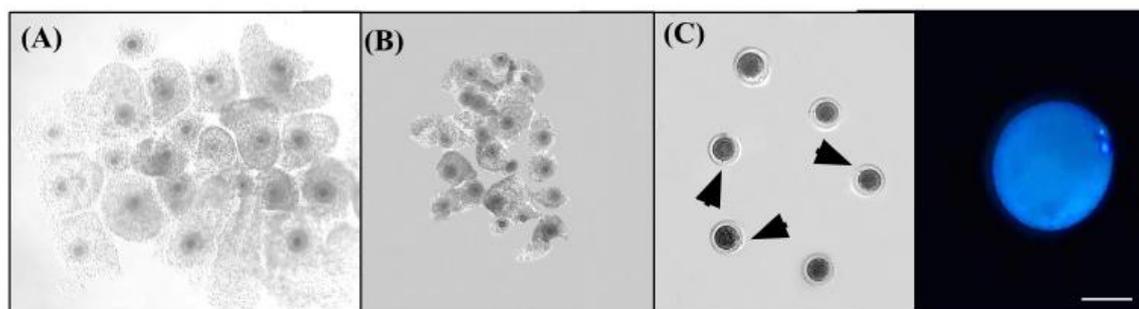
Após a MIV, oócitos foram avaliados quanto à expansão das células do *cumulus* sob esteriomicroscópio, sendo os oócitos com células do *cumulus* expandidas considerados maturados. Além disso, oócitos desnudos foram avaliados quanto à presença do 1CP e MII. Brevemente, oócitos foram desnudos usando 0,1% de hialuronidase, e marcados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 por 15 min. Após esse período, oócitos foram visualizados em microscópio de fluorescência, sendo considerados maturados aqueles apresentando o núcleo em MII e com a presença do 1CP (SANTOS *et al.*, 2019).

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão de dez repetições e foram analisados usando o software StatView 5.0. Para as análises, a normalidade e homoscedasticidade foi verificada por Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Em seguida, todos os dados foram comparados com o teste de qui-quadrado, considerando $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Para o experimento, 151 ovários foram adquiridos, onde 666 oócitos viáveis e imaturos (4,4 oócitos/ovários) foram submetidos à MIV. A Tabela 1 apresenta as avaliações quanto à expansão das células do *cumulus*, 1CP e MII de oócitos bovinos na ausência ou presença do OECS (Fig. 1A-B).

Figura 1 - Representação das etapas envolvidas na MIV de oócitos bovinos. **(A)** Oócito bovino em meio MIV contendo OECS10. **(B)** Oócito bovino em meio contendo o OECS50. **(C)** Representação da extrusão do 1CP sobre oócitos maturados em OECS10. **(D)** Oócito em MII após a maturação oocitária contendo OECS10. Escala da barra = 50 µm.





No que se refere à expansão das células do *cumulus*, foi observado que o OECS10 foi superior quando comparado ao grupo controle e OECS50. Esse resultado ocorreu porque o OECS10 garantiu um maior balanço *in vitro* de moléculas essenciais para a progressão meiótica do oócito, como o peróxido de hidrogênio (KALA *et al.*, 2017). Essa afirmação é justificável, pois durante a extrusão do 1CP, foi observado que o OECS10 foi também superior ao OECS50. Contudo, entende-se que apesar do OECS50 ter promovido um maior desequilíbrio do microambiente, esta concentração não pode ser considerada tóxica, já que após a avaliação da MII, não foi observado diferença entre os grupos analisados.

Tabela 1 - Influência do OECS sobre as células do *cumulus* e maturação nuclear de oócitos bovinos.

Grupos	Avaliação das células do <i>cumulus</i>	Avaliação da maturação nuclear	
	Expansão (%)	1CP	MII (%)
Controle	96,4 ± 1,8 ^b	78,4 ± 7,0 ^{ab}	67,0 ± 9,2 ^a
OECS10	100,0 ± 0,0 ^a	83,2 ± 3,0 ^a	75,7 ± 3,3 ^a
OECS50	94,7 ± 3,0 ^b	77,0 ± 2,8 ^b	69,1 ± 5,1 ^a

^{ab}: Valores com diferentes letras sobrescritas dentro das colunas são diferentes (P < 0,05). 1CP: primeiro corpúsculo polar; MII: metáfase II.

Conclusão

Portanto, 10 µg/mL de OECS foi a melhor concentração para ser empregada durante a MIV de oócitos bovinos, pois não causou efeitos deletérios para as células do *cumulus*, e ainda auxiliou o oócito durante a retomada da meiose no ambiente *in vitro*.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).



Referências

FERRONATTO, A.N; ROSSI, R.C. Extraction and application of orange peel essential oil as a natural ingredient. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 12, p. 78–93, 2018.

KALA, M; SHAIKH, M.V; NIVSARKA, M. Equilibrium between antioxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 16, p. 28–35, 2017.

OLIVEIRA, L.R.M; AQUINO, L.V.C; SANTOS, M.V.O; FREITAS, V.J.F; BERTINI, L.M; PEREIRA, A.F. Effects of different concentrations of eugenol in maturation medium on bovine oocyte, oxidative status and preimplantation embryos. **Animal Production Science**, v. 62, p. 142–151, 2022.

SANTOS, M.V.O; NASCIMENTO, L.E; PRAXEDES, E.A; BORGES, A.A; SILVA, A.R; BERTINI, L.M; PEREIRA, A.F. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. **Theriogenology**, v. 128, p. 74–80, 2019.

VIDAL, M.F. Produção comercial de frutas na área de atuação de BNB. **Caderno Setorial ETENE**, p. 1–4, 2021.



AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DAS REGIÕES DA PELE DE *Dasyprocta leporina* VISANDO A FORMAÇÃO DE BANCOS DE CÉLULAS SOMÁTICAS

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF *Dasyprocta leporina* SKIN REGIONS AIMING FOR FORMATION OF SOMATIC CELL BANKS

João Vitor da Silva VIANA^{1*}; Leonardo Vitorino Costa de AQUINO¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Yasmin Beatriz França MOURA¹; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Moacir Franco de OLIVEIRA²; Alessandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil. ² Centro de Multiplicação de Animais Silvestres, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

*joavitorvianajr@gmail.com

Resumo

Os bancos de células somáticas representam ferramentas valiosas para a conservação de mamíferos silvestres, tais como a *Dasyprocta leporina*, espécie de grande importância ecológica e científica. Uma das estratégias no estabelecimento destes bancos consiste na escolha das regiões da pele a ser empregada como fonte de células somáticas. Portanto, o objetivo foi avaliar morfologicamente diferentes regiões da pele de *D. leporina* visando a formação dos bancos de células somáticas para a espécie. Para tanto, pele da região auricular e abdominal de três animais foram recuperadas, processadas histologicamente, coradas com hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori, e analisadas quanto à espessura da epiderme e derme, número de células epidermais e fibroblastos e quantificação de fibras colágenas. Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados usando o software StatView 5.0. Nenhuma diferença foi observada quanto à espessura da epiderme entre a pele auricular e abdominal; contudo, a espessura da derme da região abdominal ($1908,7 \pm 121,1 \mu\text{m}$) foi maior que a da região auricular ($1550,5 \pm 95,9 \mu\text{m}$). Além disso, a região abdominal apresentou valores maiores de células epidermais, fibroblastos e percentual de fibras colágenas quando comparada à pele auricular ($P < 0,05$). Esses resultados indicam que embora a região auricular seja menos invasiva que a coleta da região abdominal, esta última apresenta um maior número de células somáticas que podem ser empregadas nas biotecnologias de reprogramação celular.

Palavras-chave: Roedor histricomorfo, bancos de recursos somáticos, histologia.

Abstract

Somatic cell banks represent valuable tools for the conservation of wild mammals, such as *Dasyprocta leporina*, a species of great ecological and scientific importance. One of the strategies in the establishment of these banks is the choice of skin regions to be used as sources of somatic cells. Therefore, the aim was to evaluate morphologically different regions of the skin of *D. leporina* aiming at the formation of somatic cell banks for the species. Then, skin from the auricular and abdominal regions of three animals were recovered, histologically processed, stained with hematoxylin-eosin and Gomori's trichrome, and analyzed for epidermis and dermis thickness, number of epidermal cells and fibroblasts and quantification of collagen fibers. All data were expressed as mean \pm standard error and analyzed using the StatView 5.0 software. No difference



was observed for epidermis thickness between auricular and abdominal skin; nevertheless, the thickness of the dermis of the abdominal region ($1908.7 \pm 121.1 \mu\text{m}$) was greater than that of the auricular region ($1550.5 \pm 95.9 \mu\text{m}$). Moreover, the abdominal region showed higher values of epidermal cells, fibroblasts and percentage of collagen fibers when compared to the auricular skin ($P < 0.05$). These results indicate that although the ear region is less invasive than the collection of the abdominal region, the latter presents a greater number of somatic cells that can be used in cell reprogramming biotechnologies.

Keywords: Hystricomorph rodent, somatic resource banks, histology.

Introdução

A *Dasyprocta leporina* é um roedor histricomorfo encontrado na América do Sul com relevante função na dispersão de sementes. Além de seu papel ecológico, a *D. leporina*, por ter uma população estável, pode ser empregada como modelo para outras espécies do mesmo gênero ameaçadas à extinção.

Neste cenário, buscando desenvolver bancos de células somáticas como estratégia de conservação e multiplicação da espécie, o Laboratório de Biotecnologia Animal (LBA) tem desenvolvido protocolos de criopreservação de tecidos somáticos, avaliando técnicas de conservação (COSTA *et al.*, 2020) e soluções de criopreservação (RODRIGUES *et al.*, 2021). Recentemente, nós demonstramos a obtenção de linhagens celulares derivadas destes tecidos (PRAXEDES *et al.*, 2021) e, agora, nós temos investigado outras fontes de tecidos somáticos.

Em geral, a pele tem sido o órgão de escolha na obtenção de tecidos somáticos a serem empregados para recuperação celular, visando a clonagem reprodutiva e indução de células à pluripotência (PRAXEDES *et al.*, 2021). Contudo, variações morfológicas podem ser observadas de acordo com a região da pele e essas diferenças podem interferir na criopreservação de tecidos e células, em virtude da penetração dos crioprotetores (TURNER *et al.*, 2015).

Portanto, o objetivo foi avaliar morfológicamente a pele da região auricular e abdominal de *D. leporina* visando à formação de bancos de células somáticas para a espécie.

Material e métodos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFERSA, no. 21/2019), em conformidade com o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, no. 71837-1). Amostras da pele da região auricular e abdominal foram coletadas de três fêmeas adultas de *D. leporina* provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres



(CEMAS/UFERSA) e anestesiadas, conforme PRAXEDES *et al.* (2021). Após a colheita, as amostras foram transportadas em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos-antimicóticos, a 37 °C por até 1 h.

No laboratório, amostras foram fragmentadas em 9,0 mm³ e fixadas em paraformaldeído a 4% por sete dias. Após a fixação, fragmentos foram processados histologicamente, seccionados em 5,0 µm e corados com hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori. Para a análise com hematoxilina e eosina, foram obtidas 20 imagens em aumento de 40×, e mensurações da epiderme e derme (µm), bem como da quantificação de células epidermais e fibroblastos foram realizadas, usando o software Image J (US National Institutes of Health, Bethesda, Rockville, USA).

Para a análise com tricrômico de Gomori, as lâminas foram expostas a solução de Bouin por 1 h. Posteriormente, o núcleo das células foi marcado com hematoxilina férrica de Weigert, enquanto as fibras colágenas foram marcadas com solução tricrômica. Finalmente, foram obtidas 10 imagens em aumento de 40× e quantificadas a proporção volumétrica de fibras colágenas por meio de uma razão de número de fibras colágenas por área de tecido selecionada usando o software Image J.

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão, sendo analisados quanto à normalidade e homocedasticidade pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente, usando o software StatView 5.0. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em arco-seno e analisados pelo teste de ANOVA, seguido do teste de Turkey, enquanto os dados de quantificação celular foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn.

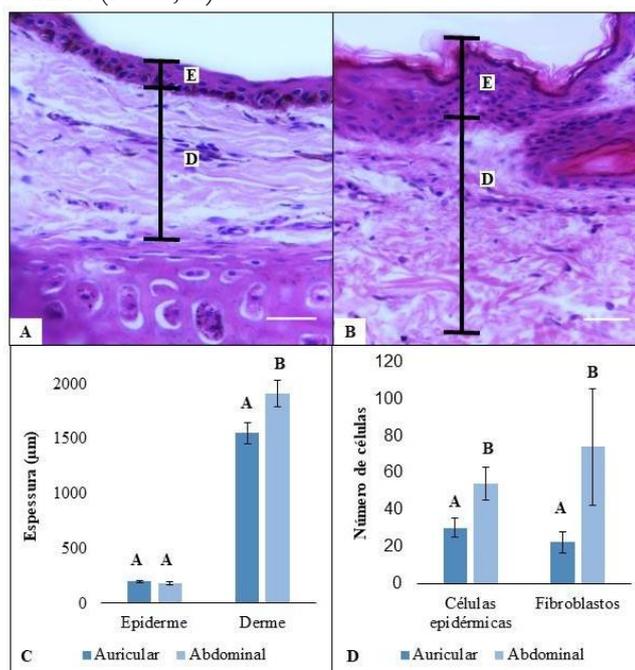
Resultados e discussão

Após as análises das lâminas histológicas usando a coloração de hematoxilina e eosina (Fig. 1A e B), nenhuma diferença foi observada para a espessura da epiderme entre a pele auricular (196,9 ± 12,3 µm) e abdominal (182,9 ± 18,7 µm, Fig. 1C). Contudo, a espessura da derme da região abdominal (1908,7 ± 121,1 µm) foi maior que da região auricular (1550,5 ± 95,9 µm, 1C). Resultados similares foram observados por SANTOS *et al.* (2021) ao compararem a pele da região auricular e abdominal de onça-pintada (*Panthera onca*).

Além disso, a região abdominal apresentou valores superiores de células epidermais (54,0 ± 8,8 versus 30,2 ± 5,1) e fibroblastos (74,0 ± 31,3 versus 22,5 ± 5,6) quando comparada à região

auricular, respectivamente (Fig. 1D). Regiões da pele com maior quantitativo de células somáticas (fibroblastos e/ou células epidermais) são interessantes como fontes de células a serem empregadas em estudos de reprogramação nuclear (HENN *et al.*, 2020).

Figura 1 - Espessura e quantificação celular das regiões auricular e abdominal de *D. leporina*. (A) Região auricular. (B) Região abdominal. (C) Espessura das camadas da epiderme e derme. (D) Quantidade de células epidérmicas e fibroblastos. E indica epiderme e D derme. ^{A,B}: diferenças dentro de cada parâmetro entre pele auricular e abdominal ($P < 0,05$).



Adicionalmente, a região abdominal ($73,4 \pm 5,3\%$) apresentou maior percentual de fibras colágenas quando comparada à região auricular ($61,5 \pm 8,4\%$, $P < 0,05$, Fig. 2). Esse maior quantitativo de fibras colágenas apresenta um efeito positivo na reorganização da estrutura tecidual, auxiliando na remodelação, no recrutamento de células e biomoléculas necessárias para uma melhor recuperação dos tecidos (CRAMER; BADYLAK, 2020).

Figura 2 - Quantificação das fibras colágenas da pele de *D. leporina*. (A) Região auricular. (B) Região abdominal. (C) Percentual de fibras colágenas. ^{A,B}: P < 0,05.



Conclusão

Esses resultados indicam que embora a região auricular seja menos invasiva que a coleta da região abdominal, esta última apresenta um maior número de células somáticas que podem ser empregadas para a clonagem reprodutiva. Mais estudos são necessários para conhecer a qualidade destas células após cultivo *in vitro* destes tecidos.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

COSTA, C.A.S.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C, SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Effects of vitrification techniques on the somatic tissue preservation of agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, p. 165–170, 2020.

CRAMER, M.C.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix-based biomaterials and their influence upon cell behavior. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 48, p. 2132–2153, 2020.

HENN, D.; CHEN, K.; MAAN, Z.N.; GRECO, A.H.; ILLOUZ, S.E.M.; BONHAM, C.A.; BARRERA, J.A.; TROTSYUK, A.A.; PADMANABHAN, J.; MOMENI, A.; WAN, D.C.; NGUYEN, D.; JANUSZYK, M.; GURTNER, G.C. Cryopreserved human skin allografts promote angiogenesis and dermal regeneration in a murine model. **International Wound Journal**, v. 17, p. 925–936, 2020.

PRAXEDES, E.A.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.M.; VIANA, J.V.S.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Establishment, characterization, and cryopreservation of cell



lines derived from red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758): A study in a wild rodent. **Cryobiology**, v. 98, p. 63–72, 2021.

RODRIGUES, L.L.V.; BORGES, A.A.; NASCIMENTO, M.B.; AQUINO, L.V.C.; SANTOS, M.D.C.B.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Evaluation of different cryoprotectant solutions for cryopreservation of somatic tissues of *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758). **CryoLetters**, v. 42, p. 210–219, 2021.

SANTOS, M.D.C.B.; AQUINO, L.V.C.; NASCIMENTO, M.B.; SILVA, M.B.; RODRIGUES L.L.V.; PRAXEDES, E.A.; OLIVEIRA, L.R.M.; SILVA, H.V.R.; NUNES, T.G.P.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Evaluation of different skin regions derived from a postmortem jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758), after vitrification for development of cryobanks from captive animals. **Zoo Biology**, v. 40, p. 280–287, 2021.

TURNER, N.J.; PEZZONE, D.; STEPHEN, F.; BADYLAK, S.F. Regional Variations in the Histology of Porcine Skin. *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 21, p. 373–384, 2015.



AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO OVÁRIO DE ARIRANHA (*PTERONURA BRASILIENSIS*)

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF GIANT OTTER (*Pteronura brasiliensis*) OVARY

Hevellen Vitória dos Santos GOMES^{1*}; Vera Maria Ferreira DA SILVA²; Rodrigo de Souza AMARAL¹

¹Laboratório de Morfofisiologia e Reprodução Animal – LaMoRA, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM, Manaus, AM, Brasil. ²Laboratório de Mamíferos Aquáticos – LMA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia – INPA, Manaus, AM, Brasil. *hevellen200711@gmail.com

Abstract

The giant otter is an endangered semiaquatic mammal endemic to south America. The studies on morphological aspects of the giant otter (*Pteronura brasiliensis*) contributes to the adaptive physiological mechanisms of the species to its habitat, in view of the risks of extinction that this species suffer. The aim of the present study was to morphologically describe the giant otter ovary. For this, ovaries of two adult females previously fixed in formalin were evaluated macroscopically and under traditional histology techniques. Macroscopically the presence of small antral follicles and corpus luteum was observed, and later the organs were collected and processed by traditional histology techniques and analyzed, and preantral follicles were found, antrals and corpus luteum. Of all these stages of development, mean diameters of follicles, oocytes and corpus luteum are described.

Keywords: histology, ovaries, mustelid, reproduction, anatomy.

Introdução

A ariranha (*Pteronura brasiliensis*) é um mamífero de hábitos semiaquático, pertencente à família Mustelidae. É classificada pela Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais – IUCN (2022), como “em perigo de extinção”, por conta da caça ilegal no passado, que teve uma redução drástica da população. Ao longo dos anos, algumas informações sobre os aspectos reprodutivos desta espécie foram descritas. Entretanto, com relação aos aspectos anatômicos do aparelho reprodutor, os dados são escassos. Oliveira *et al.* (2011), descreveram a morfologia dos testículos, porém não há descrições a respeito da morfologia reprodutiva das fêmeas, sendo estas informações de extrema importância para a compreensão das adaptações morfológicas ao contexto ecológico que a espécie está inserida. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi descrever as características morfológicas do ovário de *Pteronura brasiliensis*.

Material e métodos



Para a realização do estudo, foram utilizados os ovários de duas fêmeas de ariranha adultas previamente fixadas em formol a 10% e depositados na Coleção Úmida do Laboratório de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – LMA/INPA.

Os ovários foram medidos com o auxílio de um paquímetro e suas características macroscópicas registradas. Posteriormente, os ovários foram seccionados e processados por técnicas tradicionais de histologia, realizando-se a inclusão em parafina, com obtenção de cortes histológicos de 5µm de espessura, de forma seriada, os quais foram posteriormente corados com hematoxilina-eosina. As lâminas histológicas foram analisadas por microscopia óptica e fotografadas, e as estruturas encontradas (folículos e corpos lúteos) foram identificadas, classificadas e mensuradas.

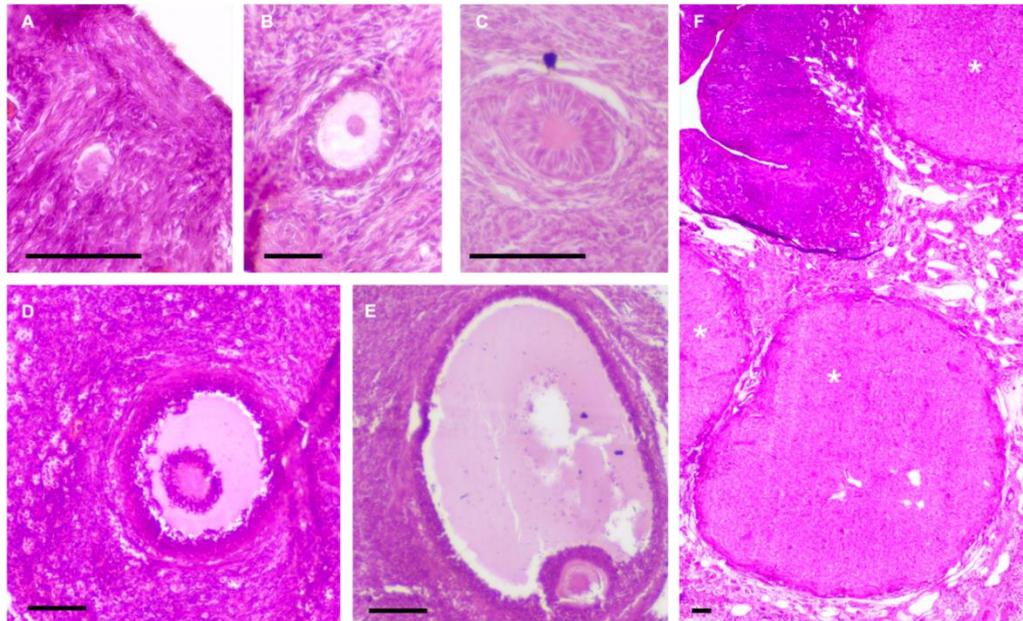
Resultados e discussão

Os ovários apresentaram um formato esférico com dimensões médias de $11,0 \pm 1,0$ mm de comprimento, $9,0 \pm 0,5$ mm de largura e $9,0 \pm 4,5$ mm de espessura. Macroscopicamente foi possível observar a presença de folículos antrais de diferentes tamanhos e de corpos lúteos.

Na avaliação histológica foi possível observar a presença folículos primordiais, primários, secundários, terciários e de corpos lúteos.

Os folículos seguiram a classificação descrita por Junqueira e Carneiro (2013), com folículos primordiais apresentando o oócito circundado por uma camada de células da granulosa achatadas (Figura 1A), os folículos primários unilaminar apresentando o oócito circundado por uma camada de células da granulosa cuboidais (Figura 1B), os folículos primários multilaminar apresentando o oócito circundado por mais de uma camada de células da granulosa cuboidais (Figura 1C), os folículos secundários apresentando o início da formação do antro (Figura 1D), e os folículos terciários com o antro bem formado e o oócito envolto pelas células do cumulus (Figura 1E).

Figura 1 – Fotomicrografia do folículo primordial (A), primário unilaminar (B), primário multilaminar (C), secundário (D) e terciário (E), de três corpos lúteos (F; asteriscos) em ariranha (*Pteronura brasiliensis*). Barra = 100µm.



As médias dos diâmetros de cada tipo de folículo observado estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Parâmetros morfométricos (média±DP) dos folículos ovarianos de ariranha (*Pteronura brasiliensis*).

Folículos	N	Diâmetro do folículo (µm)
Primordial	5	36,6±10,5
Primário unilaminar	7	40,7±26,5
Primário multilaminar	11	63,7±49,5
Secundário	4	154,0±85,3
Terciário	7	574,5±336,1

Folículos antrais foram observados nos dois ovários de cada uma das fêmeas, indicando atividade ovariana em ambos os ovários. Da mesma forma, foi observada a presença de corpo lúteo em ambos os ovários. Nas duas fêmeas foram observados de 3 a 5 corpos lúteos distribuídos entre os dois ovários (Figura 1). Esta informação corrobora o número de filhotes nascidos em cada



gestação (1 a 6 filhotes), segundo Duplaix *et al.* (2015). O diâmetro médio dos corpos lúteos foi de $1.178,1 \pm 341,7 \mu\text{m}$.

Conclusão

Em conclusão, o presente estudo relatou a descrição da morfometria dos folículos ovarianos e dos corpos lúteos de ariranha (*Pteronura brasiliensis*). De maneira geral as estruturas ovarianas apresentaram características morfológicas semelhantes às descritas em outros mamíferos, bem como com as informações já descritas a respeito dos aspectos reprodutivos da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEAM pela bolsa concedida.

Referências

DUPLAIX, N.; EVANGELISTA, E.; ROSAS, F.C.W. Advances in the study of giant otter (*Pteronura brasiliensis*): ecology, behavior, and conservation: a review. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 10, n. 2, p. 75-98, 2015.

IUCN. IUCN Red List of Threatened Species. Gland: The World Conservation Union, 2022. Disponível em: <<http://www.iucn.org>>. Acesso em: 05 out. 2022.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia básica., texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

OLIVEIRA, G.C.R.; BARCELLOS, J.F.M.; LAZZARINI, S.M.; ROSAS, F.C.W. Gross anatomy and histology of giant otter (*Pteronura brasiliensis*) and Neotropical otter (*Lontra longicaudis*) testes. **Animal Biology**, v. 61, p. 175-183, 2011.



COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO CONGELADO EM
TES-TRIS COM GEMA DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E DE PATA (*Anas
platyrhynchos*)

VIABILITY COMPARISON OF FROZEN BUFFALO SEMEN IN TES-RIS WITH
CHICKEN (*Gallus gallus domesticus*) AND DUCK (*Anas platyrhynchos*) YOLKS

André de Medeiros Costa LINS^{1*}; Adriana Novaes dos REIS²; Lilian Kátia Ximenes SILVA²;
Aluizio Otávio Almeida da SILVA²; Lauro Nogueira Barbosa NETO³; Juliana Gonçalves LIMA⁴;
Janayna Barroso dos SANTOS⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia – ReproAmazon, Universidade Federal do
Pará – UFPA, Castanhal, Pará, Brasil.

²Central de Biotecnologia de Reprodução Animal – CEBRAN, Universidade Federal do Pará - UFPA, Castanhal,
Pará, Brasil

³Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará - UFPA, Castanhal, Pará, Brasil.

⁴Programa de Residência em Clínica Médica e Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará - UFPA,
Castanhal, Pará, Brasil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal na Amazônia – PPGSAAM, Universidade Federal do Pará -
UFPA, Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: andre.lins@ufpa.castanhal.ufpa.br

Abstract

Artificial insemination is one of the main biotechniques that enhance the spread of paternal genetic, directly linked to the use of frozen semen, which causes deleterious changes in the structure and integrity of sperm membranes, compromising their function. To avoid this cellular damage, there is a need to use suitable dilution media that recover as many viable cells as possible after thawing. For this, the TES-TRIS extender with 20% chicken yolk (20 GG) in its constitution was compared with the same extender, however, replacing the chicken yolk with the duck yolk (20 GP) at the same concentration. Six ejaculates were collected from four buffalo bulls submitted to the traditional freezing process, using thin straws and extenders with 20 GG and 20 GP. After cryopreservation, the samples were thawed at 37°C for 30 seconds and analyzed for the following aspects: progressive rectilinear motility, vigor and hypoosmotic test. The values obtained were submitted to ANOVA and Tukey's test at 5% probability. There was no difference in motility and vigor between 20 GG and 20 GP (58.02 ± 16.93 vs. 57.76 ± 18.46) (2.60 ± 0.58 vs. 2.79 ± 0.51) for frozen semen, but there was a difference between the values of the hypoosmotic test (61.14 ± 15.27 vs. 53.87 ± 13.56 ; $p < 0.05$). These data demonstrate that for frozen semen, the extender with 20% chicken yolk presented better results, and its use is recommended for the cryopreservation of buffalo semen.

Keywords: cryopreservation, extender, hypoosmotic test.

Introdução



A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bubalinos é uma das principais biotecnologias para disseminação de genética superior (BARUSELLI *et al.*, 2013) e seu sucesso está ligado ao uso do sêmen congelado (BRITO *et al.*, 2018). No entanto, o processo de congelamento ocasiona danos aos espermatozoides, o que se faz necessário o estudo de alternativas para aperfeiçoar a criopreservação, em especial sobre a utilização de novos diluidores para a congelamento de sêmen em bubalinos (VALE *et al.*, 1991; CASTRO, 2010).

A criopreservação é um processo complexo, que produz danos físicos, bioquímicos e funcionais às membranas e estruturas dos espermatozoides, devido a prejuízos causados pela mudança de temperatura, pela formação de gelo intracelular, pelo aumento da concentração de solutos no meio extracelular e pelas injúrias oxidativas (HOLT, 2000; WATSON, 2000). Para que se diminua estes efeitos, há a necessidade de se avaliar substâncias no diluidor, que possam obter células viáveis após a descongelamento (SILVA *et al.*, 2002).

A gema de galinha é bastante utilizada na constituição dos diluentes, por ser de fácil aquisição e baixo custo (BATHGATE; MAXWELL; EVANS, 2006), sendo geralmente adicionada em uma concentração de 20% (MANJUNATH, 2012). Porém, trabalhos demonstraram que a gema de pata contribui para a viabilidade do sêmen de búfalos pós-descongelamento (RAWASH *et al.*, 2020), aumentando a fertilidade *in vivo* (EL-SHARAWY *et al.*, 2015), por apresentar maiores proporções de ácidos graxos monoinsaturados, menor quantidade de colesterol e maior quantidade do fosfatidilinositol (BATHGATE *et al.*, 2006).

Por estes motivos o presente experimento teve como objetivo comparar a viabilidade do sêmen bubalino criopreservado com diluidor TES-TRIS acrescido de 20% de gema de galinha (*Gallus gallus domesticus*) ou de 20% de gema de pata (*Anas platyrhynchos*) para avaliar se a diferença na constituição da gema da pata pode ser uma boa alternativa.

Material e métodos

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), localizada em Castanhal, Pará. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análise, Processamento e Industrialização de Sêmen da CEBRAN. Foram utilizados quatro touros bubalinos, mantidos em regime de semi-estabulação. As coletas aconteceram três vezes por semana com uso de vagina artificial adaptada à espécie (VALE, 2011), sendo colhido seis ejaculados por animal, totalizando 24 amostras.



Imediatamente após a coleta, o sêmen foi analisado quanto às características físicas, tais como volume, cor, aspecto, e características microscópicas: turbilhonamento, motilidade progressiva retilínea, vigor espermático, viabilidade dos espermatozoides (eosina-citrato), patologia espermática, concentração, assim como o teste hiposmótico (REIS *et al.*, 2017) para avaliar a integridade da membrana dos espermatozoides. Somente amostras com parâmetros recomendados pelo CBRA (2013) foram utilizadas.

Foram testados dois diluidores: TES-TRIS com 20% de gema de galinha (20 GG) e TES-TRIS com 20% de gema de pata (20 GP). As amostras foram submetidas a congelação padrão da CEBRAN preconizada por Ohashi e Baruselli (2008), sendo o envase realizado em palhetas de 0,25 ml (20 x 10⁶ espermatozoides/dose), já identificadas com o número do animal, o tratamento e a data da coleta, e seladas com esferas metálicas.

As doses foram descongeladas em água a 37°C por 30 segundos e em seguida, essas amostras e avaliadas quanto a motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA pelo software BioEstat 5.3* e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Resultados e discussão

Os dados obtidos para as características físicas e morfológicas do sêmen fresco foram: volume (2,74 ml \pm 1,63), concentração (1439,90x10⁶sptzs/ml \pm 569,90), turbilhonamento (3,9 \pm 0,30), motilidade (85,24 \pm 5,12), vigor (3,9 \pm 0,30), coloração eosina-citrato (85,29% \pm 4,97) e patologias espermáticas (defeitos maiores 4,19% \pm 1,69 e defeitos menores 7,14% \pm 1,96), sendo todos esses parâmetros de acordo com as recomendações do CBRA (2013).

As avaliações iniciais do sêmen neste trabalho se mostraram semelhantes aos de Reis *et al.* (2015), no entanto, superiores aos de Ximenes *et al.* (2020). Essas variações em búfalos são normais, devido a utilização de animais diferentes, além das influências da sazonalidade, clima, horário e método de colheita do sêmen (ALMEIDA, 2018; HENRY *et al.*, 2017b). Além disso, os animais submetidos às coletas neste experimento já estavam em regime semanal de coleta ininterrupto, o que contribui para melhor qualidade espermática, por evitar envelhecimento das reservas extragonadais de espermatozoides (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Houve diferenças estatísticas entre todos os parâmetros avaliados do sêmen quando se comparou antes e após a congelação ($p < 0,05$), não existindo, entretanto, diferenças entre os mesmos parâmetros quando se avaliava os grupos experimentais (Tabela 1). Quando se avaliou o



sêmen descongelado entre os dois meios extensores utilizados, houve diferença apenas na avaliação da integridade da membrana plasmática (HOST – $p < 0,05$), com os melhores resultados obtidos com o diluidor TES-TRIS com 20% de gema de galinha, sendo ambos os grupos eficientes após a descongelação segundo o CBRA (2013).

Tabela 1 - Motilidade progressiva retilínea, vigor e integridade da membrana plasmática do sêmen bubalino congelado nos diluentes 20 GG e 20 GP.

Diluentes	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Hiposmótico (%)
20 GG – Pré-congelação	74.29 ± 5.88 ^a	3.52 ± 0.51 ^a	82,76 ± 10.16 ^a
20 GP – Pré-congelação	77.14 ± 4.55 ^a	3.52 ± 0.51 ^a	82,76 ± 10.16 ^a
20 GG – Pós-congelação	58.02 ± 16.93 ^b	2.60 ± 0.58 ^b	61.14 ± 15.27 ^b
20 GP – Pós-congelação	57.76 ± 18.46 ^b	2.79 ± 0.51 ^b	53.87 ± 13.56 ^c

^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

A diminuição nos percentuais da motilidade progressiva retilínea do sêmen descongelado para o recém colhido são relacionados com as lesões nas estruturas e na integridade das membranas espermáticas, devido a maior susceptibilidade ao choque térmico (HENRY; ECHEVERRI, 2013) ou ao estresse oxidativo aos quais os espermatozoides são submetidos (KADIRVEL; KUMAR; KUMARESAN, 2009). A criopreservação também interfere negativamente no vigor espermático, o que provavelmente ocorre devido ao consumo de substratos do meio, como a frutose, e metabolização de ATP (KAMP *et al.*, 2003).

As motilidades obtidas nos dois grupos apresentaram valores numéricos maiores que o relatado por Reis *et al.* (2017) (42.25% ± 6.98) e menores que Ximenes *et al.* (2020) (60.2% ± 1.2), utilizando TES-TRIS com 20% de gema de galinha. O vigor apresentou-se maior (GG 2.60 ± 0.58^b e GP 2.79 ± 0.51^b) do que o relatado por Ximenes *et al.* (2020) (2.5 ± 0.1). Até então, não existia relatos do uso de gema de pata no diluente à base de TES-TRIS, considerado por Vale *et al.* (1984) como o meio extensor de eleição para bubalinos.

O uso do gema de pata em diluente TRIS ácido cítrico (20%) obteve melhores taxas de motilidade para sêmen bubalino: 58,33% ± 1,66 (RAWASH *et al.*, 2020); 59,6% ± 0,44 (EL-SHARAWY *et al.*, 2015); 54,17% ± 0,44 (WAHEED; AHMAD; JAMIL-UR-RAHMAN, 2012) e 56,0% ± 3,0 (ANDRABI *et al.*, 2008). Nesse trabalho, o uso de gema de pata não melhorou a motilidade pós descongelação (58,02 ± 16,93 – 20 GG; 57,76 ± 18,46 – 20 GP).



Com relação à integridade de membrana plasmática, os resultados obtidos no teste HOST para o sêmen congelado são diferentes dos citados na literatura, visto que nos trabalhos que utilizaram a gema de pata em substituição à gema de galinha obtiveram melhor proteção à membrana plasmática: $65,00\% \pm 1,15$ (RAWASH *et al.*, 2020); $69,1\%$ utilizando 15% de gema de pata (EL-SHARAWY *et al.*, 2015), $87,57\% \pm 0,38$ (WAHEED; AHMAD; JAMIL-UR-RAHMAN, 2012) e $81,8\% \pm 1,9$ (ANDRABI *et al.*, 2008). Essa diferença foi atribuída às maiores proporções, na gema de pata, de ácidos graxos monoinsaturados e menor quantidade de colesterol (BATHGATE *et al.*, 2006), que é importante para proteger os espermatozoides contra o choque frio (LADBROOKE; WILLIAMS; CHAPMAN, 1968).

Conclusão

Para as amostras submetidas ao congelamento, o diluente 20 GG apresentou os melhores resultados, sendo recomendado para esse processo.

Referências

- ANDRABI, S. M. H. et al. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 427–433, 2008.
- CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 104 p, 2013.
- EL-SHARAWY, M. E. et al. Effect of Duck Egg Yolk on Cryopreservation and Fertility of Egyptian Buffalo Effect of Duck Egg Yolk on Cryopreservation and Fertility of Egyptian Buffalo Bull Semen. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v. 3, n. 4, p. 1133–1138, 2015.
- KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 1–3, p. 125–134, 2009.
- REIS, A. N. et al. Comparative evaluation between the extenders TES-TRIS and ACP- 112 ® and the association of Sálva Marajó oil (*Lippia origanoides*) in the quality of cryopreserved buffalo sperm Avaliação comparativa entre os diluidores TES-TRIS e ACP-112 ® e a associação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 6, p. 3613–3628, 2017.
- XIMENES, L. K. et al. Increased quality of in natura and cryopreserved semen of water buffaloes supplemented with saturated and unsaturated fatty acids from the palm oil industry. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 1–17, 2020.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

WAHEED, S.; AHMAD, N.; JAMIL-UR-RAHMAN, H. Evaluation of duck egg yolk for the cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 131, n. 1–2, p. 95–99, 2012.



COMPARAÇÃO DOS EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (*Citrus sinensis* e *Syzygium aromaticum*) SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

COMPARISON OF THE EFFECTS OF ESSENTIAL OILS (*Citrus sinensis* AND *Syzygium aromaticum*) ON *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES

Leonardo Vitorino Costa de AQUINO^{1*}; Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹; Lhara Ricarliany Medeiros de OLIVEIRA¹; Tássio Lessa do NASCIMENTO²; Luciana Medeiros BERTINI²; Luanna Lorena Vieira RODRIGUES¹; Alessandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Apodi, RN, Brasil.

*E-mail: leonardovt@live.com

Resumo

O uso alternativo de óleos essenciais durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos têm sido uma das alternativas visando melhorar a qualidade das células em cultivo. Considerando essa abordagem, o objetivo foi comparar a eficiência do óleo essencial de *Citrus sinensis* (OECS) e de *Syzygium aromaticum* (OESA) sobre a MIV de oócitos bovinos. Para tanto, oócitos foram maturados na ausência (grupo controle) e na presença de 10 µg/mL de OECS (OECS10) ou 10 µg/mL de OESA (OESA10) por 24 h, a 38,5°C e 5% de CO₂. Após a MIV, a expansão e viabilidade das células do *cumulus* foram avaliadas em estereomicroscópio e ensaio de azul de tripan, respectivamente. Além disso, oócitos foram analisados quanto à extrusão do primeiro corpúsculo polar (1CP) por estereomicroscópio, bem como seu estágio nuclear por Hoescht 33342. Após oito repetições, observou-se que o OECS10 melhora positivamente as taxas de expansão e viabilidade das células do *cumulus*, além de permitir uma taxa maior de 1CP quando comparado ao OESA10. Nenhuma diferença foi observada para as taxas de MII entre os grupos. Portanto, OECS10 garante um melhor sistema de cultivo *in vitro* de gametas em bovinos, possibilitando ser uma alternativa durante a maturação oocitária.

Palavras-chave: Produtos naturais, produção *in vitro* de embriões, gametas.

Abstract

The alternative use of essential oils during *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes has been one of the alternatives to improve the quality of cells in culture. Considering this approach, the aim was to compare the efficiency of essential oil of *Citrus sinensis* (EOCS) and *Syzygium aromaticum* (OESA) on IVM of bovine oocytes. Then, oocytes were matured in the absence (control) and in the presence of 10 µg/mL of EOCS (EOCS10) or 10 µg/mL of OESA (EOA10) for 24 h under temperature and modified atmosphere (38.5 °C and 5% CO₂). After the period, the expansion and viability of *cumulus* cells were evaluated under stereomicroscope and trypan blue assay, respectively. Furthermore, oocytes were analyzed for extrusion of the first polar body (1PB) by stereomicroscope, as well as their nuclear stage by Hoescht 33342. After eight replications, it was observed that EOCS10 positively improves the expansion and viability rates of *cumulus* cells, as well as allowing a higher rate of 1PB when compared to EOSA10. No difference was observed for MII rates between groups. Therefore, EOCS10 guarantees a better system of *in vitro* culture of gametes in cattle, making it possible to be an alternative supplementation during oocyte maturation.



Keywords: Natural products, *in vitro* embryo production, gamete.

Introdução

Os óleos essenciais são misturas complexas que apresentam em sua composição química fitoquímicos que conferem diferentes propriedades biológicas. Tais substâncias têm despertado o interesse científico, especialmente para a composição dos meios empregados na produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos. Em geral, a PIVE possibilita o ganho genético dos rebanhos e, embora promissora, apenas 30% dos oócitos imaturos alcançam o estágio de blastocistos e 12% conseguem ter crias nascidas (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020), demonstrando a necessidade de melhoria desta técnica. O principal fator relacionado a essa variação está na competência oocitária, que pode ser relacionada ao ambiente intrínseco e extrínseco do sistema de cultivo oocitário (SIRARD *et al.*, 2006).

Neste cenário, o emprego de óleos essenciais poderia auxiliar positivamente o metabolismo das células, permitindo a obtenção de uma melhor qualidade oocitária. Nesse contexto, insere-se os óleos essenciais de *Citrus sinensis* (OECS) e de *Syzygium aromaticum* (OESA) que em sistemas de cultivo celular, já demonstraram inúmeros benefícios após o seu uso (BRANCO *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

Considerando os benefícios promovidos pelo OECS e OESA, o objetivo foi comparar a eficiência destas substâncias durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, visando auxiliar a competência meiótica destas células.

Material e métodos

Inicialmente, para a extração dos óleos essenciais de *C. sinensis* e *S. aromaticum*, a técnica por hidrodestilação foi empregada. Brevemente, cascas de laranja orgânica foram colhidas, secadas e trituradas. Em seguida, foram encaminhadas ao processamento para a recuperação do óleo essencial, onde foi possível obter 2,9% de rendimento (% m/m; 0,84 g mL^{-1} de densidade). Já para a obtenção do OESA, botões florais foram coletados e processados, e ao final do processo, 11,4% de rendimento (% m/m; 0,96 g mL^{-1}) foi recuperado. Ainda, a cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (CG/EM) foi a técnica utilizada para identificar os compostos fitoquímicos presentes.

Para a recuperação oocitária, ovários provenientes do abatedouro local foram utilizados para recuperação do complexo *cumulus*-oócito (CCOs). Para tanto, ovários foram transportados ao



laboratório em solução salina (NaCl, 09%; 35–37°C) suplementado com 0,05 mg/mL de antibiótico. No laboratório, os ovários foram lavados e os folículos de 2–8 mm foram aspirados usando seringa e agulha (5 mL/21G), contendo meio de colheita e manipulação oocitária (MCM: TCM199-HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), piruvato de sódio (0,2 mM) e 1% de solução de antibiótico-antimicótico).

Para a MIV, oócitos foram maturados em meio MCM acrescido por 20 µg/mL de FSH/LH contendo 10 µg/mL de OECS (OECS10) ou 10 µg/mL de OESA (OESA10). A concentração do OECS e OESA foi baseada na eficiência positiva dessas substâncias durante o cultivo de células e gametas (ROBERTO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2019). Oócitos maturados na ausência de óleo essencial foram considerados o grupo controle.

Após a MIV, oócitos foram avaliados quanto à expansão das células do *cumulus* usando estereomicroscópio. Além disso, células do *cumulus* foram avaliadas quanto a sua viabilidade. Para isso, foram removidas utilizando a hialuronidase 0,1%, e em seguida, coradas com o azul de tripan (0,2%), onde células viáveis foram consideradas incolores, enquanto as inviáveis foram coradas em azul.

Adicionalmente, oócitos foram avaliados quanto à maturação nuclear. Para tanto, foi observada a presença do primeiro corpúsculo polar (1CP) em estereomicroscópio, bem como o estágio nuclear (metáfase II ou MII). Brevemente, oócitos foram fixados em 4% de paraformaldeído, marcados por Hoescht 33342 e visualizados sob microscopia de fluorescência, sendo considerado maturados aquelas células que estivessem em metáfase II, enquanto as outras fases nucleares foram consideradas gametas imaturos.

Finalmente, os dados foram expressos em média \pm erro padrão e analisados usando o software StatView 5.0. Para todas as análises, foram realizadas oito repetições, onde a normalidade dos dados foi verificada com o teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homoscedasticidade foi analisada pelo teste de Levene. Todos os dados foram comparados com o teste de qui-quadrado, sendo considerado o $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Após a avaliação por CG/EM, foi observado no OECS dois componentes majoritários, sendo o D-limoneno (48,5%) e o α -terpineol (40,2%) e 11,2% de outros fitoquímicos. No OESA, o eugenol (68,3%), beta-cariofileno (19,6%) e o acetato de eugenila (11,9%) foram identificados como os três únicos componentes do óleo.

Para os experimentos de MIV, um total de 173 ovários foram recuperados e aspirados, resultando em 648 estruturas viáveis, que foram distribuídas aleatoriamente para as repetições. A Tabela 1 apresenta os resultados da expansão (Fig. 1A-B) e viabilidade das células do *cumulus*, bem como da maturação nuclear de oócitos bovinos.

Figura 1 - Imagem representativa das etapas da maturação *in vitro* de oócitos bovinos. (A) Oócito bovino maturado em meio MIV contendo OECS10. (B) Oócito bovino maturado em meio MIV contendo OESA10. Escala de barra = 50 μ m.

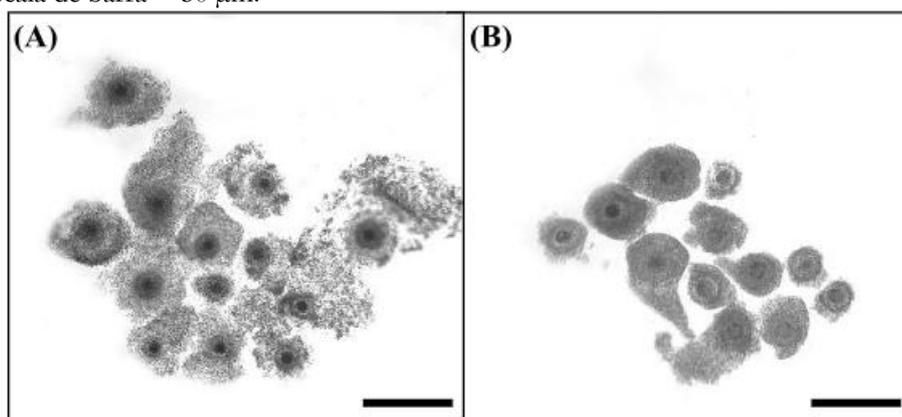


Tabela 1 - Influência do OECS e OESA sobre as células do *cumulus* e maturação nuclear de oócitos bovinos.

Grupos	Avaliação das células do <i>cumulus</i>		Avaliação da maturação nuclear	
	Expansão (%)	Viabilidade (%)	1CP	MII (%)
Controle	97,4 \pm 1,7 ^{ab}	68,4 \pm 7,7 ^b	73,0 \pm 7,0 ^b	77,9 \pm 5,5 ^a
OECS10	100,0 \pm 0,0 ^a	89,7 \pm 1,8 ^a	82,4 \pm 7,2 ^a	77,1 \pm 7,2 ^a
OESA10	96,0 \pm 1,8 ^b	52,5 \pm 3,1 ^c	77,3 \pm 5,2 ^b	75,8 \pm 3,4 ^a

^{ab}: Valores com diferentes letras sobrescritas dentro das colunas são significativamente diferentes (P < 0,05). 1CP: primeiro corpúsculo polar; MII: metáfase II.

No que se refere à expansão das células do *cumulus*, foi observado que o OECS10 apresentou taxas superiores quando comparado ao OESA10 (**Tabela 1**), e isso é importante porque durante a MIV, estas células são consideradas como indicadores da progressão meiótica do oócito. Nesse contexto, o OECS10 pode ter possibilitado um microambiente mais adequado para a maturação oocitária, favorecendo uma melhor taxa de expansão. Essa afirmação pode ser



justificada porque a viabilidade das células do *cumulus* em meio contendo o OECS10 foram maiores que 80% quando comparados ao controle e OESA10.

Além disso, OECS10 garantiu taxas superiores da extrusão do 1CP de oócitos bovinos (Tabela 1), enquanto o OESA10 foi similar ao grupo sem antioxidante. Isso pode ter ocorrido porque OESA10 provavelmente atuou fortemente no controle do sistema redox de oócitos bovinos, ocasionando um desequilíbrio de moléculas que são essenciais para a progressão meiótica do oócito, como o peróxido de hidrogênio (SOTO-HERAS; PARAMIO, 2020).

Conclusão

O OECS10 garante um melhor sistema de cultivo *in vitro* de gametas em bovinos, possibilitando ser uma alternativa durante a maturação oocitária, quando comparado ao OESA10.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

- BRANCO, Y.N.T.C.C.; BRANCO, M.A.C.; BARCANTE, F.P.S.; NASCIMENTO, I.M.R.; SOUZA, J.A.T. Action of the limonene (S) – (-) on sperm kinetics of cryopreserved semen of bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 40, p. 200–201, 2016.
- OLIVEIRA, L.R.M.; AQUINO, L.V.C.; SANTOS, M.V.O.; FREITAS, V.J.F.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F. Effects of different concentrations of eugenol in maturation medium on bovine oocyte, oxidative status and preimplantation embryos. **Animal Production Science**, v. 62, p. 142–151, 2022.
- ROBERTO, D.; MICUCCI, P.; SEBASTIAN, T.; GRACIELA, F.; ANESI, C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: Relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, p. 38–44, 2009.
- SANTOS, M.V.O.; NASCIMENTO, L.E.; PRAXEDES, E.A.; BORGES, A.A.; SILVA, A.R.; BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. **Theriogenology**, v. 128, p. 74–80, 2019.
- SIRARD, M.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126–136, 2006.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

SOTO-HERAS, S; PARAMIO, M. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342–350, 2020.



COMPARAÇÃO ENTRE OS DILUENTES À BASE DE ÁGUA DE COCO EM PÓ E TRIS ADICIONADOS DE ÓLEO DE PEQUI NA CONGELAÇÃO DO SÊMEN DE OVINOS

COMPARISON BETWEEN POWDERED COCONUT WATER AND TRIS EXTENDER ADDED WITH PEQUI OIL ON THE FREEZING OF RAM SEMEN

Eduarda de Oliveira Machado RIBEIRO^{1*}; Davi Felipe Soares COELHO¹; Thiago Vitor Gomes de SALES¹; Thamyras Myrela da Silva NASCIMENTO¹; Emilly Gabriele Correia Bezerra BRITO¹; Oscar Oliveira BRASIL²; Angélica Maria Luna COSTA¹; Gabriela Liberalino LIMA¹.

¹Departamento de Zootecnia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Crato, CE, Brasil; ²Departamento de Zootecnia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Crateús, CE, Brasil * eduarda.oliveira.machado61@aluno.ifce.edu.br

Abstract

The selection of extender is a fundamental point for the cryopreservation of ovine semen, considering that it will provide the adequate medium for sperm metabolism. Thus, the objective of this work was to compare the sperm parameters of cryopreserved ram semen in TRIS-based extenders versus powdered coconut water (ACP), as well as the effect of pequi oil (OP) in each dilution in the maintenance of these parameters. For that, six breeder rams were used and four ejaculates from each one were collected (n=24), then they were evaluated for motility and vigor after thawing. The results found showed that the extender with ACP and OP was the most effective, demonstrating a statistical difference ($p < 0.05$) in both parameters comparing to its control and in motility in relation to TRIS. In conclusion, the ACP+5%OP extender was better in maintaining sperm parameters than TRIS.

Keywords: antioxidant; cryopreservation; spermatozoon.

Introdução

Nas últimas décadas, esforços têm sido feitos para otimizar as biotécnicas de reprodução animal existentes, uma vez que seu uso é uma condição de importante para aumentar a eficiência produtiva dos rebanhos. Nesse contexto, a criopreservação de sêmen tem possibilitado o armazenamento por tempo indeterminado de germoplasma de diversas espécies. Entretanto, em ovinos, a inseminação artificial utilizando sêmen congelado-descongelado ainda apresenta limitações e índices baixos de fertilidade, principalmente devido aos danos causados às células espermáticas durante o processo de congelação (SOUZA, MORAES, TONIOLLI, 2017).

Para reduzir as perdas de qualidade seminal é importante que se utilize um diluente adequado, dentre os diluentes convencionais mais utilizados na congelação de sêmen ovino pode-se citar o TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano)/gema de ovo como um dos mais utilizados,



apresentando taxas satisfatórias de motilidade espermática pós descongelção (ROSTAMI *et al.*, 2020).

No intuito de aumentar a viabilidade espermática pós descongelção, diluentes alternativos têm sido propostos, como a água de coco em pó (ACP), a qual tem se mostrado eficiente para o sêmen de diferentes espécies, incluindo ovinos (BRITO *et al.*, 2019). Isso se deve a sua composição, contendo sais, proteínas, carboidratos, vitaminas, gorduras neutras e fosfolipídios, além de ácidos, como por exemplo, o 3-indolacético (AIA) que tem ação no metabolismo dos espermatozoides garantindo maiores taxas de motilidade e fertilidade (SANTOS *et al.*, 2018).

Adicionalmente, dada a maior sensibilidade da membrana espermática ovina à peroxidação lipídica, pesquisas tem se concentrado na adição de substâncias com ações antioxidantes (ROSTAMI *et al.*, 2020). Dessa forma, o óleo do pequi poderia constituir uma fonte alternativa de oxidantes, a ser utilizado na criopreservação do sêmen ovino. Em sua composição são encontradas substâncias com propriedades antioxidantes, como ácidos graxos, compostos fenólicos, vitaminas e flavonoides como a quercertina, a qual, por exemplo, já foi utilizada como aditivo ao diluente para congelação de sêmen ovino, apresentando resultados positivos (LACERDA-NETO *et al.*, 2017; JIMÉNEZ-AGUILAR *et al.* 2021).

Dessa forma, o objetivo do estudo foi comparar parâmetros espermáticos do sêmen criopreservado de ovinos em diluente à base de TRIS ou de ACP, acrescidos de óleo de pequi.

Material e métodos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IFCE (CEUA-IFCE) sob nº 9274111020. O trabalho foi realizado no Departamento de Pesquisa, Extensão e Produção (DPEP) e no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (BIOREP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *campus* Crato (7°12'18.1"S 39°26'52.8"W). Para a experimentação foram utilizados seis reprodutores ovinos da raça Santa Inês, clinicamente saudáveis e com exame andrológico satisfatório. A colheita do sêmen foi realizada com o uso de vagina artificial e manequim.

Foram obtidos 4 ejaculados de cada animal os quais foram submetidos a avaliação macroscópica e microscópica (CBRA, 2013) imediatamente após a coleta e então diluídos em TRIS ou água de coco em pó (ACP Biotecnologia®, Fortaleza-Ceará, Brasil). Em todos os diluentes foi adicionado 15% de gema de ovo e 6% de glicerol, acrescido ou não de 5% de óleo de pequi (OP),



obtendo-se uma concentração final de 200×10^6 espermatozoides/ml. O óleo de pequi foi obtido a partir de produtores locais. As amostras foram então envasadas em palhetas francesas (0,5 ml), posicionadas na rampa de congelação e submetidas a congelação de acordo com Cavalcante *et al.*, (2018) modificado.

Para tanto, as palhetas foram refrigeradas utilizando-se geladeira/refrigerador ($0,2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, durante 2 a 3 h) até atingir a temperatura de 4°C . Após período de equilíbrio ($\sim 1\text{h}$), as amostras foram congeladas em vapor de nitrogênio líquido ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) por 15 min e, então, imersas em nitrogênio líquido para armazenamento em botijões criogênicos ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$). A descongelação foi realizada após um intervalo mínimo de uma semana de armazenamento ($37^\circ\text{C}/30 \text{ s}$). Em seguida as amostras foram avaliadas quanto á motilidade e vigor espermático.

Os dados foram expressos em média e desvio padrão, adotou-se delineamento inteiramente casualizado, ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação das médias, com $P < 0,05$.

Resultados e discussão

O total de 24 ejaculados foi obtido. O sêmen fresco apresentou cor branca e aspecto leitoso-aquoso, com volume médio de 0,93 ml, concentração de $4029,2 \times 10^6$ espermatozoides/ml, motilidade de 93,33% e vigor de 4,92, estando de acordo com os parâmetros recomendados pelo CBRA (2013) para sêmen ovino *in natura*. Foi observada redução significativa da motilidade e vigor espermático após a congelação do sêmen, independente do diluente utilizado.

Analisando os resultados por diluente (Tabela 1), é possível verificar que não houve efeito significativo ao se adicionar 5% de OP ao diluente TRIS. Por outro lado, maior percentual de motilidade foi observado ao se utilizar o OP no diluente à base de ACP ($P < 0,05$). Ao se comparar os diluentes, o maior percentual de motilidade espermática foi observado ao se utilizar o diluente ACP adicionado de 5% de OP ($P < 0,05$), não sendo verificadas diferenças entre os diluentes sem a adição deste.

Tabela 1 - Motilidade total (%) do sêmen criopreservado ovino diluído em ACP ou TRIS acrescido ou não de 5% de óleo de pequi.

Diluente	Adição de óleo de pequi	
	0%	5%
ACP	$17,29 \pm 14,59^b$	$42,5 \pm 16,55^{aA}$



TRIS 21,04±18,65 28,75±18,95^B

^{ab} - Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05)

^{A,B} - Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (P<0,05)

Em relação ao vigor espermático, observou-se maior valor (P<0,05) ao se utilizar OP, tanto para o TRIS (0%OP: 1,75±1,07 *versus* 5% OP: 2,12±1,03) como para o ACP (0%OP: 1,37±0,8 *versus* 5%OP: 2,62±0,65). Não foram observadas diferenças entre os diluentes (ACP/0%OP: 1,37±0,87 *versus* TRIS/0%OP: 1,75±1,07; ACP/5%OP: 2,62±0,65 *versus* TRIS/5% OP: 2,12±1,03).

Os maiores valores obtidos para os parâmetros espermáticos avaliados utilizando o OP pode ser atribuído aos compostos com potencial ação antioxidante encontrados em sua composição. Paulo *et al.* (2017) analisando a bromatologia do óleo de pequi identificou que esse composto é rico nos ácidos graxos linolelaídico e oléico os quais tem interação positiva com as membranas celulares e a produção de energia das células, podendo ser responsável por melhorar a motilidade e o vigor espermático, possivelmente por facilitar o transporte de ácidos graxos através do interior da membrana mitocondrial, permitindo a sua β -oxidação produzindo ATP e fornecendo energia para o movimento espermático. Adicionalmente, a incorporação de ácidos graxos poliinsaturados ao diluente pode influenciar positivamente a motilidade celular, favorecendo a fluidez da membrana e melhorando a motilidade e a intensidade do movimento (CONNOR *et al.*, 1998).

A interação dos compostos encontrados no OP e na ACP podem ter contribuído para os maiores resultados observados ao se utilizar este diluente, sendo sugeridos estudos mais aprofundados para comprovar esta hipótese.

Conclusão

Pode-se concluir que o diluente ACP com adição de 5% de OP, é eficiente na criopreservação de sêmen de ovinos, pois garante motilidade acima do limite desejado e um vigor melhor que o observado sem o seu uso. Dessa forma, são necessários mais estudos e adequações no protocolo de diluição, no intuito de melhorar ainda mais a criopreservação do sêmen ovino.



Agradecimento

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM - UERN), Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA – UFERSA), ACP Biotecnologia®, IFCE.

Referências

BRITO, B. F. SANTOS, B. M. B.; CABRAL, L. A. R.; LIMA, D. B. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Influência do meio de conservação à base de água de coco em pó (ACP-102c) na manutenção da atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 47. p. 1715. 2019.

CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; AGUIAR, G. V; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; MOURA, A. A. A.; NUNES, J. F. Perfil proteico do plasma seminal ovino e sua relação com a criopreservação nos diluentes TRIS e Água de Coco em Pó / Protein profile of ram seminal plasm and its relation relationship with cryopreservation in TRIS and Powdered Coconut Water extender. **Ciênc. Anim.** v. 28. n. 3. p. 45-55, 2018.

CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

CONNOR, W.E.; LIN, D.S.; WOLF, D.P.; ALEXANDER, M. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm 1. **J. Lipid Res.**, v.39, p.1404-1411, 1998.

JIMÉNEZ-AGUILAR, E.; QUEZADA-CASASOLA, A.; PRIETO-CARAVEO, M.; OROZCO-LUCERO, E.; ITZÁ-ORTIZ, M.; CARRERA-CHÁVEZ, J. Evaluación de la adición de quercetina y vitamina E al medio de criopreservación de semen ovino sobre la fertilidad in vivo. **Abanico Veterinario**, v. 11. 2021.

LACERDA NETO, L.J.; RAMOS, A.G.B.; SALES, V.S.; SOUZA, S.D.G.; SANTOS, A.T.L.; OLIVEIRA, L.R.; KERNTOPF, M.R.; ALBUQUERQUE, T.R.; COUTINHO, H.D.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Gastroprotective and ulcer healing effects of hydroethanolic extract of leaves of *Caryocar coriaceum*: mechanisms involved in the gastroprotective activity. **Chemico-Biological Interactions**, [S.L.], v. 261, p. 56-62, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.020>.

PAULO, Cícera R. V. ; PEREIRA, G. F. F. ; MACHADO, S. M.; RODRIGUES, G. F. F. ; COSTA, M. G. J. ; SOUSA, O. E. Composição química e atividade antibacteriana do óleo fixo da amêndoa de *Caryocar coriaceum*. In: Reunião regional da SBPC no cariri, 1., 2017, Crato - Ce. **Anais/Resumos da Reunião Regional da SBPC no Cariri/CE** - ISSN 2178-3969. Crato - CE: Sbpnet, 2017. p. 1-3.



ROSTAMI, B.; EBRAHIMI, D.; SADEGHIPANAH, H.; MASOUMI, R.; SHAHIR, M. H. Effects of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and antioxidants on freezability of ram semen. **Cryobiology**. v. 1. n. 92. p. 62-66. Feb 2020. doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.10.198. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31669434.

SANTOS, B. M. B.; BRITO, B. F.; MAIA, L. C. P.; PIRES, R. S. de C.; SALGUEIRO, C. C. de M; NUNES, J. F. Congelação do sêmen de pequenos ruminantes sem uso de gema de ovo utilizando bases vegetais em substituição à gema de ovo. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v. 42, n. 3-4, p. 96-100, jul./dez. 2018.

SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; TONIOLLI, R. 2017. [Addition of antioxidants in ram semen and the effects after thawing.] Adição de antioxidantes ao sêmen de carneiros e seus efeitos após a descongelação. **Pesq. Vet. Bras.** v. 37, n. 5. p. 471-478. 2017.



COMPARAÇÃO ENTRE OS DILUENTES TRIS-GEMA E INRA-96® NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO

COMPARISON BETWEEN TRIS-EGG YOLK AND INRA-96® EXTENDERS ON THE CANINE SEMEN CRYOPRESERVATION

Tayná Moura MATOS*¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Ana Gloria PEREIRA¹; Luana Grasielle Pereira BEZEIRRA¹; Romário Parente dos SANTOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹.

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, Brasil.

*E-mail: taynamouramatos@gmail.com

Abstract

The objective was to evaluate the efficiency of the commercial extender INRA-96® for the cryopreservation of canine semen. Ejaculates from six French Bulldogs were collected by digital manipulation of the penile bulb. Semen samples were evaluated for motility (0-100%), vigor (0-4), viability using fluorescent probes (%) and sperm morphology (%). Ejaculates were diluted in Tris-egg yolk (20%) or INRA-96® both supplemented of 3% glycerol, and cryopreserved in liquid nitrogen. After one week, samples were thawed and evaluated as described for fresh semen. After thawing, the Tris-egg yolk extender provided a significantly most efficient ($P < 0.05$) preservation of sperm motility and vigor than INRA-96®; however, no differences were observed between extenders with regards to sperm morphology and viability. In summary, we suggest the use of a Tris-egg yolk extender for canine semen cryopreservation.

Key words: Biobank, semen, cryopreservation, commercial extenders, cryoprotectants.

Introdução

Atualmente, os cães assumiram um papel de suma importante na vida do homem moderno e com o aumento significativo na criação, houve um grande interesse na reprodução e na preservação de algumas raças com características desejáveis. Nesse sentido, pesquisadores estudaram e aperfeiçoaram as biotécnicas reprodutivas em busca de um melhor aproveitamento genético. A criopreservação do sêmen tem sido a principal biotécnica aplicada na conservação de material genético desta espécie, sendo amplamente difundida e empregadas com intuito de favorecer a preservação de material genético de alto valor. Inclusive, os protocolos desenvolvidos para os cães domésticos podem ser extrapolados para espécies canídeas em estado de



vulnerabilidade, como o Lobo Guará (*Chrysocyon brachyurus*) e Raposinha do Campo (*Lycalopex vetulus*).

A técnica de criopreservação de sêmen visa promover a conservação de germoplasma masculino por tempo indeterminado em botijão criobiológico em baixas temperaturas -196°C , por meio da inativação celular fazendo com que a atividade biológica entre em repouso, incluindo as reações que levam a apoptose celular e a degradação do DNA. No entanto, o estresse térmico, ocasionado pelo processo de congelamento e descongelamento está relacionado, exclusivamente, a injúrias que ocorrem às estruturas das membranas dos espermatozoides (PEÑA *et al.*, 1998). Com intuito de reduzir os danos causados à membrana espermática pelo processo de congelamento, diferentes diluentes têm sido propostos (MARTIN, 1963; FOOTE, 1964), sendo aqueles à base de Tris os mais utilizados entre os grupos de pesquisa. Entretanto, este diluente carrega a desvantagem da necessidade de sua elaboração a cada uso, o que reduz a expansão do seu uso.

Para ultrapassar essa limitação, diferentes diluentes quimicamente definidos têm sido propostos, mas muito destes ainda não comercializados em território brasileiro. Assim, alternativamente, poder-se-ia aventar o uso de diluentes comercializados para outras espécies domésticas. Dentre estes, destaca-se o INRA-96 (IMV Technologies, França), um diluente à base de leite que foi desenvolvido principalmente para manter a fertilidade do sêmen de garanhões durante o armazenamento refrigerado a 4 ou 15°C por até 72 h (BATELLIER *et al.*, 1997). Uma vez que o mesmo inclusive já foi utilizado eficientemente para a criopreservação de sêmen equino (FAYRER-HOSKEN *et al.*, 2008), acredita-se que a adição de um crioprotetor viabilizaria seu uso também para os cães. Assim, objetivou-se comparar a eficiência do diluente comercial INRA-96® com o diluente Tris-gema, ambos adicionados de glicerol, na conservação dos aspectos quantitativos do sêmen canino após os processos de criopreservação e descongelamento.

Material e métodos

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFERSA (nº. 05/2021). O ensaio experimental foi conduzido no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal/UFERSA. Para tanto, foram selecionados seis cães da raça Buldogue Francês, oriundos de criadores particulares localizados na cidade de Mossoró/RN. O sêmen foi coletado de acordo com a disponibilidade dos animais, adotando-se o método de manipulação digital do bulbo peniano para a obtenção dos ejaculados.



As amostras de sêmen foram imediatamente avaliadas macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração e volume. E, em seguida, foram analisadas microscopicamente quanto à motilidade (0-100%) e vigor (0-4) em microscopia de luz (100x), morfologia espermática por meio de esfregaços de sêmen corados em Rosa de Bengala e avaliados em microscopia de luz (1000x; 200 células/lâmina). Foi também avaliada a viabilidade celular utilizando-se a associação dos fluoróforos iodeto de propídio (3 µL; 0,5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato e PBS) e Hoechst 33342 (3 µL; 40 mg/mL em PBS), após incubação por 10 min a 37° C, e classificando-se as células em inviáveis quando marcadas parcialmente ou totalmente em vermelho (iodeto de propídio) e viáveis quando marcadas em azul (Hoechst 33342) em microscopia de fluorescência (400x; 100 células/lâmina).

Os ejaculados foram diluídos em Tris-gema de ovo (20%) ou INRA-96* à temperatura ambiente (27 °C) e refrigeradas a 15° C durante 40 minutos em caixas isotérmicas e posteriormente estabilizados a 5° C por mais 30 min em incubadora biológica (Quimis, Diadema, SP, Brazil). Procedeu-se a adição de glicerol (3%) às amostras que atingiram uma concentração final de 100 milhões de espermatozoides/mL. Estas foram então envasadas em palhetas plásticas de 0,25 mL, posicionadas em contato com o vapor do nitrogênio (5 cm) por 5 min e então acondicionadas em botijão criobiológico a –196° C. Decorrido pelo menos 1 semana, as amostras foram descongeladas em banho maria a 37° C por 1 min e os parâmetros espermáticos foram avaliados conforme o sêmen fresco.

Os resultados foram analisados utilizando-se o programa StatView 5.0 e os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Inicialmente, os valores percentuais foram submetidos à transformação angular em ArcoSeno, e posteriormente, as características do sêmen fresco e descongelado foram comparadas utilizando ANOVA seguida do teste t não pareado. Foi considerado o nível de significância quando $P < 0,05$.

Resultados e discussão

O sêmen fresco dos animais, conforme mostrado na Tab. 01, apresentou parâmetros cinéticos com valores dentro da normalidade para a espécie (DOBRINSKY *et al.*, 1993; SILVA; VERSTEGEN, 1995). No entanto, verificou-se que a descongelação provocou uma redução significativa dos parâmetros espermáticos avaliados (Tab. 01). Estas reduções em tais parâmetros têm sido também descrita por outros autores para o sêmen do cão após o procedimento de



criopreservação (PEÑA *et al.*, 1998). Ressalta-se que tais parâmetros obtidos durante a avaliação clássica do sêmen configuram-se em uma importante métrica para se estimar a possibilidade de utilização do sêmen pós-descongelamento em procedimentos de inseminação artificial, sendo a motilidade espermática o principal parâmetro microscópico corriqueiramente considerado (England, 1993).

Tabela 01 - Valores médios (média \pm EP) para os parâmetros espermáticos no sêmen canino fresco e descongelado, utilizando-se os diluentes Tris-gema e INRA-96® acrescidos de glicerol (n=6).

	Sêmen fresco	Sêmen descongelado	
Parâmetros espermáticos		Tris-gema	Inra-96
Motilidade (%)	93,3 \pm 3,6 ^A	40,8 \pm 3,3 ^{B^a}	20 \pm 5 ^{B^b}
Vigor	4,5 \pm 0,2 ^A	3,7 \pm 0,2 ^{B^a}	2,7 \pm 0,3 ^{B^b}
Viabilidade (%)	80,2 \pm 2,6 ^A	28 \pm 6,3 ^{B^a}	30,2 \pm 6,6 ^{B^a}
Morfologia Normal (%)	78,6 \pm 4,1 ^A	73,8 \pm 3,7 ^{B^a}	70,8 \pm 4,5 ^{B^a}

^{AB}Letras maiúsculas sobrescritos indicam diferença significativa entre os grupos fresco e descongelados ($p < 0,05$);

^{aB}Letras minúsculas sobrescritos indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

Ao se comparar os dois diluentes testados, observou-se uma melhor eficiência do diluente Tris-gema em promover a conservação da motilidade e vigor nos espermatozoides caninos pós-descongelamento, em detrimento do uso do INRA-96®. De fato, o diluente Tris-gema tem sido amplamente utilizado em vários laboratórios para a congelamento do sêmen canino, principalmente, por promover uma atividade tamponante eficiente, bem como por reduzir os índices de frutólise espermática, contribuindo assim para a manutenção da qualidade espermática (SILVA *et al.*, 2000). Além disso, a ação conjunta do Tris com a gema de ovo é ressaltada pela ação desta última como um crioprotetor externo em virtude da presença de suas lipoproteínas de baixa densidade (BENCHARIF *et al.*, 2010), conhecidas por seu efeito protetor da integridade acrossomal e prevenção da reação acrossomal espontânea em cães (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001).

O diluente INRA-96® apresenta em sua constituição as proteínas micelares do leite as quais apresentam efeito crioprotetor externo, sendo então um meio convencionalmente utilizado para a refrigeração do sêmen (BATELLIER *et al.*, 1997). Assim, verificou-se que mesmo com a adição de um crioprotetor interno – o glicerol, o referido diluente não foi eficiente na preservação da motilidade e vigor espermáticos. Por outro lado, observou-se seu efeito positivo sobre a



manutenção da morfologia e viabilidade espermáticas, o que avança a hipótese de que outras concentrações do crioprotetor interno, ou mesmo outros crioprotetores, devam ser testados com o propósito de se criopreservar o sêmen canino.

Conclusão

Diante dos resultados, evidencia-se a superioridade do diluente Tris-gema sobre o diluente comercial INRA-96®, ambos acrescidos de 3% de glicerol, na criopreservação do sêmen canino. No entanto, em vias da atuação do INRA-96® na preservação da viabilidade e morfologia espermática, avança-se a continuidade de estudos de modo a utilizá-lo como alternativa para a criopreservação do sêmen do cão.

Referências

- BATELLIER, F. et al. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 391-410, 1997.
- BENCHARIF, D.; Amirat-Briand, L.; Garand, A.; Anton, M.; Schmitt, E.; Desherces, S. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). *Animal Reproduction Science*, 119(3-4): 305-313, 2010.
- DOBRINSKY, I., LULA, I., BARTH, A.D., et al. Effects of four different extenders and three different freezing rates on postthaw viability of dog semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.291-296, 1993.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog's semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p.243-255, 1993.
- FAYRER-HOSKEN, Richard et al. Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. **Journal of equine veterinary science**, v. 28, n. 11, p. 672-676, 2008.
- FOOTE, R. H. Extenders for freezing dog semen. **American journal of veterinary research**, v. 25, p. 37-40, 1964.
- IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology**, v. 55, n. 2, p. 671-684, 2001.
- MARTIN, I. C. A. The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim-milk. **Research in Veterinary Science**, v. 4, n. 2, p. 315-325, 1963.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

PEÑA, A. I. et al. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 163-174, 1998..

SILVA, Alexandre Rodrigues; CARDOSO, Rita de Cássia Soares; SILVA, Lúcia Daniel Machado da. Congelação de sêmen canino com diferentes concentrações de gema de ovo e glicerol em diluidores à base de tris e água de coco. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1021-1025, 2000.



CONSERVAÇÃO DA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE CATETOS (*Pecari tajacu*) SUBMETIDOS A REFRIGERAÇÃO EM DILUENTES COMERCIAIS

CONSERVATION OF THE BINDING CAPACITY OF PECCARY (*Pecari tajacu*) SPERM SUBMITTED TO REFRIGERATION IN COMMERCIAL DILUENTS

Romário Parente dos SANTOS^{1*}; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Yasmin Carla da Silva CAVALCANTE¹; Ana Gloria PEREIRA¹; Tayná Moura MATOS¹; Náyra Rachel Nascimento LUZ¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil;
*e-mail: romario.parente@hotmail.com

Abstract

The objective was to evaluate the efficiency of different means of dilution on the binding capacity of spermatozoa from collared peccaries submitted to refrigeration for up to 48 hours. Ejaculates from six adult males were used and evaluated for sperm parameters of total motility, osmotic response and functional test of interaction with the perivitelline membrane of the egg. Results were expressed as mean and standard error of the mean and compared by means of analysis of variance (ANOVA), complemented by Tukey's test ($P < 0.05$). Regarding the results, fresh ejaculates showed mean values of $91.3 \pm 2.0\%$ of total motility, osmotic response of $94.5 \pm 1.0\%$ and total number of attached spermatozoa of 200.2 ± 27.04 and by statistics did not differ, except for the osmotic response in the NUTRI (76.0 ± 4.77) and PRIMX (74.8 ± 4.38) groups. In conclusion, the hen egg perivitelline membrane binding test proved the efficiency of both diluents in preserving the binding capacity of spermatozoa from collared peccaries refrigerated for 48 hours.

Keywords: artificial insemination, conservation, NUTRIXcell, PRIMXcell, BTS.

Introdução

Considerando que o desenvolvimento da inseminação artificial para catetos está em evolução (PEIXOTO *et al.*, 2019), é necessário buscar métodos de processamento do sêmen que garantam de forma eficiente a manutenção dos parâmetros espermáticos e possibilitem também o intercâmbio desse material genético para outras regiões. Neste sentido, a refrigeração do sêmen garante a conservação de um maior número de células espermáticas viáveis, além de promover menores danos aos espermatozoides em relação a criopreservação (MARTINS; JUSTINO, 2015). Entretanto, por mais que a técnica de refrigeração beneficie a sobrevivência das células espermática, a mesma necessita ser cuidadosamente planejada e processada de forma correta, caso contrário, sua aplicabilidade pode ser extremamente prejudicial aos espermatozoides (KIEVITSBOSCH, 2011).



Desse modo, objetivou-se avaliar a eficiência de diferentes meios de diluição sobre a capacidade ligante dos espermatozoides de catetos submetidos a refrigeração por até 48 horas.

Material e Métodos

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFERSA (Parecer nº 12/2022). Ejaculados de seis machos adultos, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil), foram obtidos por eletroejaculação sob anestesia com propofol (5 mg/Kg IV) em bolus (CASTELO *et al.*, 2010). Foram avaliados os parâmetros espermáticos de motilidade total (análise computadorizada), resposta osmótica (teste hipo-osmótico (HOS) e teste funcional de interação com a membrana perivitelina do ovo. Todas essas avaliações foram realizadas após a coleta (avaliação do sêmen fresco) e logo após 48 horas de refrigeração (avaliação das amostras com os meios de diluição).

O sêmen de cada animal coletado, foi dividido igualmente em quatro alíquotas, referente ao número de diluentes utilizados nesse momento (Tris + gema de ovo (20%); NUTRIXcell+® (NUTRI), PRIMXcell Ultra® (PRIMX) e Beltsville Thawing Solution® (BTS) - IMV Technologies, Normandia, França). Todos os diluentes foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sendo preconizada a concentração final de 100×10^6 de espermatozoides / mL. As frações diluídas foram acondicionadas em um sistema de refrigeração para transporte (Botutainer®, Botupharma, Botucatu, Brasil) a 5 °C.

O processamento das membranas para realização do teste de ligação espermática foi conduzido conforme relatado por Corcini *et al.* (2012). Em seguida, as membranas foram distendidas e posicionadas em lâminas, e coberto com lamínulas, para realização da contagem dos espermatozoides ligados a membrana, por meio da utilização de microscopia de epifluorescência (aumento de 400×). A contagem do total de células espermáticas aderidas em cada amostra, seguirá a metodologia descrita por Barbato *et al.* (1998), na qual é preconizado realizar a contagem de seis campos distintos da membrana, para posterior estimativa.

Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média. Os efeitos da influência dos grupos experimentais sobre os parâmetros de motilidade total, resposta osmótica e na capacidade de ligação dos espermatozoides com as membranas perivitelina foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA), complementada por meio do teste de comparação de médias de Tukey. Todas as análises foram realizadas usando programa IBM SPSS Statistics (Versão 21.0. Armonk, NY: IBM Corp) com $P < 0,05$.



Resultados e Discussão

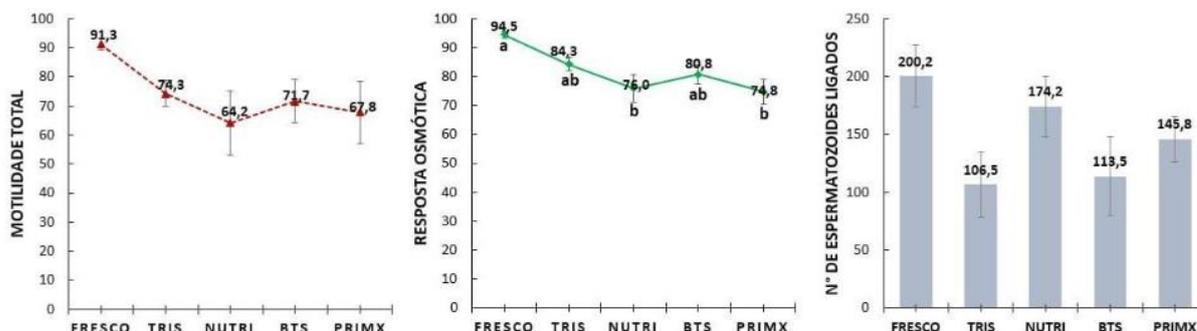
Os ejaculados frescos apresentaram valores médios de $91,3 \pm 2,0\%$ de motilidade total, resposta osmótica de $94,5 \pm 1,0\%$ e número total de espermatozoides ligados a membrana perivitelina de $200,2 \pm 27,04$. Não houve nenhuma interação significativa para os aspectos de motilidade total e número total de espermatozoides ligados. A motilidade, que é o principal parâmetro avaliado para prever a fertilidade de uma amostra de sêmen (SUAREZ; PACEY, 2006), manteve-se em valores aceitáveis durante as 48h para todos os grupos avaliados.

Os diferentes diluentes permitiram a manutenção e redução dos danos aos espermatozoides, ocasionada pela redução de temperatura durante a refrigeração até 48 h a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, exceto para a resposta osmótica, onde o NUTRI e PRIMX apresentaram redução na funcionalidade de membrana espermática (Figura 1). Diversos elementos podem impactar na fluidez e permeabilidade da membrana plasmática, nesse contexto, a temperatura é um fator crucial, porém, não é o único que ocasiona alterações durante o processo de refrigeração (SIEME *et al.*, 2015). A adição de meios de diluição ao ejaculado proporcionam melhorias na otimização e possibilidade de fracionamento do mesmo, com isso a possibilidade de utilização do sêmen nas mais diversas espécies aumenta de forma considerável, utilizando protocolos de refrigeração e meios de diluição adequados durante a sua elaboração (PIGNATARO *et al.*, 2020).

Porém, com base nos resultados, a redução significativa da funcionalidade da membrana dos espermatozoides, não foi suficiente para afetar a capacidade de ligação dos espermatozoides com a membrana perivitelina. É importante ressaltar que nos resultados preliminares obtidos nesse trabalho, há uma grande variabilidade em relação as médias e no erro-padrão das amostras observadas dentro de um quantitativo pequeno de animais, impossibilitando a observação e maior sensibilidade na obtenção de diferenças mais acentuadas em relação aos parâmetros estudados.



Figura 1 - Valores (médios \pm erro padrão da média) para motilidade total, resposta osmótica e número de espermatozoides ligados em sêmen fresco e refrigerado de catetos (*Pecari tajacu*) diluído em Tris + gema de ovo (20%), NUTRIXcell +, PRIMXcell Ultra e BTS, acondicionados em Botutainer 5 °C (n = 6) no intervalo de 48h. Letras minúsculas (^{a,b}) indicam diferença significativa para as medidas de resposta osmótica entre os grupos experimentais no intervalo de 48h. Significância de 5% (P < 0,05).



Conclusão

Em conclusão, o teste de ligação de membrana perivitelina do ovo de galinha comprovou a eficiência de ambos os diluentes em conservar a capacidade ligante de espermatozoides de catetos refrigerados por 48horas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, v.58, n.3, p.686-699, 1998.

CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris based extenders. **Theriogenology**, v. 74, n.6, p.1060-1065, 2010.

CORCINI, C. D.; SILVA, B. E.; BRIZOLARA, R. M. R.; GHELLER, S. M. M.; VARELA JUNIOR, A. S.; BONGALHARDO, D. C. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo da galinha. **Ciência Rural**, v.42, n.1, p,142-146, 2012.



KIEVITSBOSCH, T. **Refrigeração de sêmen de garanhões**/ Thatiane Kievitsbosch – Botucatu, 2011. 23f.: il. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2011.

MARTINS, M. I. M.; JUSTINO, R. C. Criopreservação espermática em felinos: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.136-140, 2015.

PEIXOTO, G. C. X.; LIMA, G. L.; MAIA, K. M.; SOUZA, A. L. P.; CASTELO, T. S.; PAIVA, A. L. C.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; BRITO, A. B.; DOMINGUES, S. F. S.; VIANA, A. C. N. P. C. S.; MELO, L. M.; COMIZZOLI, P.; SILVA, A. R. Single injection of eCG/hCG leads to successful estrous synchronization in the collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v.208, p.106-112, 2019.

PIGNATARO, T. A.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. B. S.; FREITAS, M. L.; TEIXEIRA, H. C. A.; PIVATO, I.; OLIVEIRA, R. A. Comparison of extenders and storage temperature in chilling canine semen. **Ciência Animal Brasileira**, v.20, e-52499, 2020.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behavior during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.3, p.20-26, 2015.

SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v.12, n.1, p. 23–37, 2006.



DEGENERAÇÃO FOLICULAR OVARIANA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO DECANOATO DE NANDROLONA

OVARIAN FOLLICULAR DEGENERATION IN ANIMALS SUBMITTED TO NANDROLONE DECANOATE

Ana Ruth Reinaldo MENEZES¹; João Eudes Farias CAVALCANTE FILHO²; Solano Dantas MARTINS³; Maria Alice Felipe OLIVEIRA³; Israel Levi Nascimento SILVA⁴; Alessandro Silva FERREIRA⁵; Valdevane Rocha ARAÚJO⁶

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE/CCS), Fortaleza - CE, Brasil.

²Universidade Estadual do Ceará (UECE/PPGCV), Fortaleza - CE, Brasil.

³Universidade Federal do Ceará (UFC/PPGB), Fortaleza - CE, Brasil.

⁴Universidade Estadual do Ceará (UECE/FAVET), Fortaleza - CE, Brasil.

⁵Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção - CE, Brasil.

⁶Universidade Estadual do Ceará (UECE/CCS), Fortaleza - CE, Brasil.

*E-mail: anaruth.reinaldo@aluno.uece.br

Abstract

In women, infertility can be caused by numerous factors, one of which is the undisciplined use of anabolic androgenic steroids (AAS), such as Nandrolone Decanoate (DN). AAS can impair reproductive functions, causing adverse factors such as ovarian atrophy and a decrease in the number of healthy follicles. Thus, the objective of the present work was to evaluate the effect caused by Nandrolone Decanoate on the development and structure of ovarian follicles in Wistar rats. Female Wistar rats (n=21) were randomly divided into two groups, control and Deca, the latter receiving 10 mg/kg of the steroid for 7 weeks, intramuscularly and alternately. At the end of the experiment, the ovarian tissue was dissected and fixed for histological analysis. The results showed that the administration of EAA promoted changes in follicular development.

Keywords: Anabolic steroid, Intervention, Female Reproduction.

Introdução

A preocupação com a aparência física tem ganhado notoriedade. A necessidade de alcançar o corpo ideal é apontada por diversas pesquisas como meta difícil de alcançar. Algumas alternativas utilizadas para esse processo é a prática de exercício físico constante e exagerado e o uso de anabolizantes, também conhecidos por esteroides anabólicos androgênicos (EAAs) (PAIXÃO; LOPES, 2014; POLI NETO; CAPONI, 2007).

Os EAAs são compostos análogos à testosterona que podem ser de origem natural, sintética ou semissintética, são administrados no intuito de melhorar o condicionamento físico, principalmente entre mulheres que buscam o aumento de massa magra e redução de gordura subcutânea (CUNHA *et al.*, 2004). O uso indiscriminado dos EAAs pode ocasionar diversos efeitos adversos, como diminuição da libido, aumento na secreção das glândulas sebáceas e prejuízos na



fisiologia reprodutiva em homens e mulheres (DUTRA; PAGANI; RAGNINI, 2012). Em mulheres temos reações de desordens no ciclo menstrual, oligomenorreia ou amenorreia e anovulação (CANNAVÒ *et al.*, 2001)

Um dos EAAs mais conhecidos é o decanoato de nandrolona, o qual apresenta como substância ativa a nandrolona, que possui similaridade com a testosterona, pois expressa moderado potencial androgênico e boa propriedade anabólica. É utilizado por grande parcela de atletas fisiculturistas por aparentemente proporcionar força e preparo físico (DUTRA; PAGANI; RAGNINI, 2012). Entretanto, o uso de EAAs promove efeitos colaterais indesejáveis, inclusive sobre a reprodução. Poucos estudos têm avaliado os efeitos dos esteroides sobre a histologia ovariana de fêmeas, e ainda são escassos os registros acerca da interação entre o uso desses fármacos sobre o tecido ovariano. Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do decanoato de nandrolona na histologia ovariana de ratas wistar.

Material e métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais, CEUA da Universidade Estadual do Ceará, registrado sob o nº 07223290/2020 (UECE, CE, Brasil). Foram utilizadas 21 ratas adultas, da linhagem Wistar, com aproximadamente 26 semanas de idade e peso médio entre 170 g a 200 g, alojadas e mantidas em condições adequadas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a água e alimento no Biotério do Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB), da Universidade Estadual do Ceará (UECE, CE, Brasil).

Os grupos experimentais foram denominados grupo Controle (C), com oito animais, e grupo Deca (D), com 13. Cada rata do grupo D recebeu doses suprafisiológicas de 10 mg/kg de Decanoato de Nandrolona (DN), enquanto os animais do grupo C receberam 200 μL de óleo de amendoim. Em ambos os grupos, foram realizadas aplicações via intramuscular nas patas traseiras durante 7 semanas. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados após 48h da última exposição ao fármaco. Este procedimento se deu por decapitação, após uso de anestesia de Ketamina (60 mg/Kg) e Xilazina (8 mg/Kg) via intraperitoneal. Houve a dissecação dos animais e, em seguida, os ovários foram coletados e pesados, sendo destinados às análises morfológicas.

Para histologia, os tecidos ovarianos foram fixados em paraformaldeído 4% por 4 horas em temperatura ambiente. Durante o processamento histológico, os tecidos foram desidratados



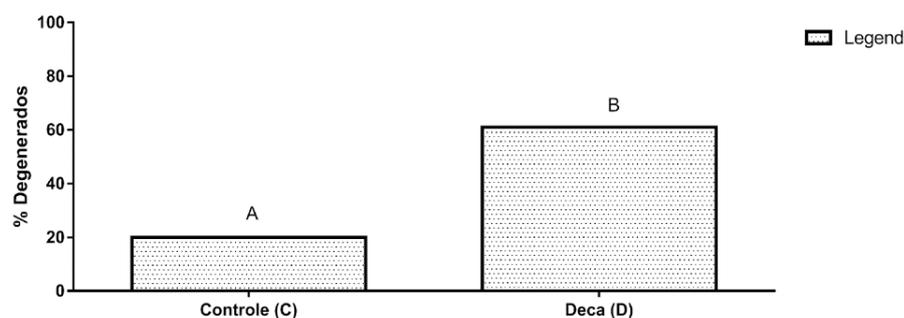
em uma série crescente de álcoois etílicos e diafanizados em xilol, seguido da impregnação e emblocamento em parafina. Finalmente, cada bloco foi seccionado em micrótomo rotativo (7 μ m) e corados com Hematoxilina-eosina (HE) para subsequente avaliação sob microscópio Nikon Eclipse E100® e as fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio HD Lite 1080P®. Os folículos foram classificados como primordiais, de transição, primários, secundários e terciários ou antrais, conforme Martins et al., 2008. Além disso classificados individualmente como histologicamente normais quando um oócito íntegro estava presente, ou seja, um oócito sem núcleo picnótico ou retração citoplasmática, circundado por células da granulosa, bem organizado em uma ou mais camadas e sem núcleo picnótico. Já os folículos degenerados foram definidos como aqueles com oócito retraído, núcleo picnótico e/ou células da granulosa desorganizadas e descoladas da membrana basal.

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação dos grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) two-way. Para a contagem folicular foi utilizado o teste Qui-quadrado. A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($P < 0,05$). O software utilizado foi o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

Resultados e discussão

Pode-se observar na figura 1, que os ovários dos animais do grupo deca (D) tiveram um maior percentual de folículos degenerados (60%) quando comparados ao grupo controle (C) (20,83%) ($P < 0,05$).

Figura 01 - Quantidade de degenerados após exposição ao Decanoato de nandrolona.

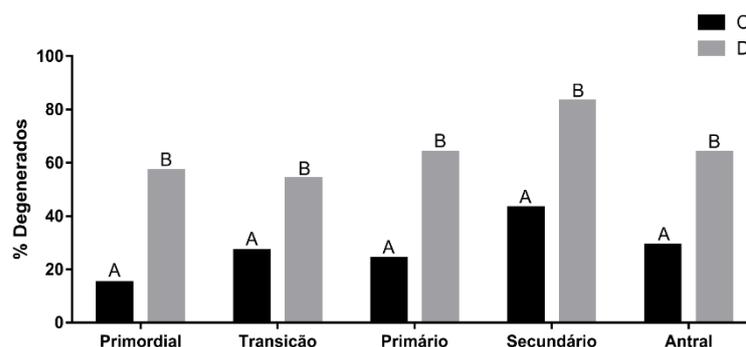


A figura 1 apresenta a porcentagem de folículos morfologicamente degenerados no grupo C e no grupo D. Podemos observar uma diferença significativa entre os grupos avaliados ($P < 0,05$).

O grupo D apresentou um maior percentual de folículos (primordiais, transição, primário, secundário e antral) degenerados, enquanto que o grupo C apresentou um percentual consideravelmente menor de folículos degenerados em todas as fases de desenvolvimento dos mesmos (figura 2).

A figura 2 demonstra a porcentagem de folículos morfologicamente degenerados no grupo controle e no grupo C e no grupo D, separando-os em fases foliculares. Desse modo podemos observar diferença significativa entre os grupos avaliados ($P < 0,05$).

Figura 02 - Porcentagem de folículos degenerados em cada fase folicular.



Os animais do grupo C apresentaram percentual de folículos normais superior a 70%, demonstrando um padrão histológico ovariano saudável caracterizado pela presença de vários folículos em diferentes estágios de desenvolvimento; enquanto que, no grupo D, números elevados de folículos degenerados em diferentes estágios de desenvolvimento, com oócito retraído, células da granulosa desorganizadas e descoladas da membrana basal e presença de núcleo picnótico. Os resultados encontrados corroboram com Sousa (2017) que em seu trabalho com associação a melatonina, o grupo de ratas submetidas ao tratamento com o esteroide apresentaram alterações histopatológicas ovarianas, caracterizadas pela intensa atresia folicular.

Foi observado que essa atresia folicular atingiu folículos em todas suas fases de desenvolvimento. Esse efeito pode estar relacionado a uma interrupção das funções neuroendócrinas, nos quais, altos níveis de testosterona alteram a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estrogênio e progesterona, podendo ocasionar uma redução destes (STRAUSS; LIGGETT; LANESE, 1985; GAO; SHORT, 1993; BRONSON; NGUYEN; ROSA, 1996; BLASBERG; LANGAN; CLARK, 1997). Além disso, Santos (2018) verificou que ratas que foram tratadas com o decanoato de nandrolona não conseguiram chegar a



preñez possivelmente por conta dessa deficiência na foliculogênese, essa que se evidencia pela intensa atresia folicular e a diminuição no número de folículos saudáveis nos diferentes estágios de maturação.

Conclusão

O período de administração do esteroide promoveu alterações no desenvolvimento e na estrutura dos folículos ovarianos, reduzindo o percentual de folículos normais em todas as categorias de classificação, podendo hipotetizar que possivelmente os níveis do hormônio folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), estrogênio e progesterona podem ter reduzido. Essas alterações podem implicar em uma possível supressão na capacidade reprodutiva. Contudo, ainda são necessários mais estudos que possam elucidar a ação e os possíveis impactos deste fármaco no sistema reprodutor feminino.

Referências

CANNAVÒ, S; CURTO, L.; TRIMARCHI, F. Exercise-related female reproductive dysfunction. *Journal of endocrinological investigation*, v. 24, n. 10, p. 823-832, 2001.

CUNHA, T S et al. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 165-179, 2004.

DE SOUZA GORINI, L et al. Efeito de doses supra fisiológicas de esteroides anabolizantes androgênicos no cerebelo de camundongos. *Revista Neurociências*, v. 23, n. 4, p. 555-561, 2015.

DUTRA, B. S. C.; PAGANI, M. M.; RAGNINI, M. P. Esteróides anabolizantes – uma abordagem teórica. *Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente*, v.3, n. 2, p.21-39, 2012.

MARTINS, F. S; SILVA, J. R. V; RODRIGUES, A. P. R; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.32, n.1, p.36-49, jan./mar. 2008. Disponível em: www.cbra.org.br

PAIXÃO, J. A. da; LOPES, M. de Fátima. Alterações corporais como fenômeno estético e identitário entre universitárias. *Saúde em Debate*, v. 38, p. 267-276, 2014.

POLI NETO, P.; CAPONI, S.N.C. A medicalização da beleza. *Interface-Comunicação, Saúde, Educação*, v. 11, p. 569-584, 2007.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

SANTOS, L. C. S. Efeito da nandrolona sobre a morfologia imunohistoquímica do útero e ovários de ratas. Dissertação de Mestrado – **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**. Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal. Recife. 2018. 74 f.: il.

SOUZA, B, R. Análise histopatológica e imuno-histoquímica dos ovários de ratas tratadas com o esteroide decanoato de nandrolona associado à melatonina. Dissertação de Mestrado – **Universidade Estadual Paulista (UNESP)**, Faculdade de Ciências e Letras, Assis. 2017. 134 f.: il.



DIAGNÓSTICO GESTACIONAL PRECOCE EM BÚFALAS POR MEIO DA ULTRASSONOGRAFIA MODO DOPPLER

EARLY GESTATIONAL DIAGNOSIS IN BUFFALOES USING DOPPLER MODE ULTRASOUND

Cauê Pires Teixeira ROCHA¹; Tullio Loureiro Góes PINTO¹; Paula Di Kassya Lima MENDES¹;
Glaucy Rafaela NASCIMENTO¹; João Victor Ferreira Wanzeler¹; Bruno Moura MONTEIRO³;
Rinaldo Batista VIANA³; Rodrigo dos Santos ALBUQUERQUE⁴

¹Discente da Universidade da Amazônia, Medicina Veterinária, Belém, Pará.

²Médico Veterinário Autônomo, Belém, Pará.

³Docente da Universidade Federal Rural da Amazônia, Medicina Veterinária, Belém, Pará.

⁴Docente da Universidade da Amazônia, Medicina Veterinária, Belém, Pará.

*E-mail: Cptr90@hotmail.com

Abstract

The ultrasound pregnancy diagnosis in Doppler mode makes it possible to identify early pregnancy due to increased blood flow and vascularization of the corpus luteum. The main objective of this study was to determine the early gestational diagnosis in buffaloes at 23 days post-F^oTAI (Fixed Time Artificial Insemination) in order to reduce the identification time and result in more effective measures in reproductive management. Crossbred buffalo females (Murrah x Mediterranean) submitted to F^oTAI were used. Two US analyzes were performed, the first with Doppler mode at 23 days after F^oTAI to identify pregnancy early, and the second at 31 days, using B-mode ultrasound to confirm pregnancy. The images were classified in peripheral and central blood perfusion score in the luteal tissue. The sensitivity and specificity values of the diagnostic test were calculated, as well as the resistance index (RI) and pulsatility index (PI) of the evaluated animals. The accuracy of the technique used was good, but it is necessary to use the procedure in a larger number of animals so that the use is viable, and understanding the anatomical and physiological characteristics of buffaloes is essential for greater results to be achieved.

Keywords: Corpus luteum, precocity, ultrasound.

Introdução

O diagnóstico gestacional é uma importante ferramenta no manejo reprodutivo que permite detectar de forma precoce a prenhez ou falha gestacional, e tem como principal objetivo reduzir o intervalo entre partos, aumentar o desempenho reprodutivo do animal e da propriedade, ademais, em propriedades que utilizem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e outras biotécnicas, assim como, auxiliar no melhoramento genético, retirando os animais que possuem problemas reprodutivos do rebanho (PALHÃO *et al.*, 2019).

Atualmente, o aprimoramento das técnicas de diagnóstico gestacional tem contribuído para a redução do tempo de diagnóstico. Hoje, existem inúmeros métodos para identificar a gestação, como a palpação retal, o uso de ultrassom modo-B e modo Doppler. Porém, cada técnica possui



determinadas desvantagens, como custo, acurácia, invasividade, além de ter tempo mínimo para garantir seu resultado (SAMIR E KANDIEL, 2019).

A ultrassonografia Modo-B trouxe grande avanço para o diagnóstico gestacional, visto que, a visualização da vesícula embrionária pode ser feita por este método a partir do 23º dia de gestação, proporcionando um diagnóstico precoce, quando comparado ao método da palpação retal, que permite maior acurácia a partir do 40º dia de gestação (PALHÃO *et al.*, 2019). Diferente da ultrassonografia modo B, o modo doppler traz um novo recurso que, além da visualização das estruturas internas, admite a viabilidade do feto e seu desenvolvimento além da avaliação funcional dos órgãos por meio da sua vascularização, especialmente da artéria uterina (HERZOG; BOLLWEIN, 2007).

O maior rebanho bubalino do ocidente encontra-se no Brasil, a criação de búfalos é uma atividade de grande importância econômica no país, tanto no setor de laticínios como de carne. Todavia, a capacidade produtiva da espécie permanece subutilizada pelos produtores brasileiros, esta situação expõe a necessidade da intensificação das pesquisas em búfalos (MELLO, 2018). O ultrassom modo Doppler possui grande potencial para uso em programas reprodutivos de fazendas no Brasil. Em vacas de leite e de corte, o uso do modo Doppler trouxe resultados comprovados para avaliação do corpo lúteo por meio do fluxo sanguíneo e possibilitou o diagnóstico gestacional a partir do 20º dia de gestação (PUGLIESI *et al.*, 2017). Porém, poucos estudos foram realizados em búfalos no Brasil para realização de diagnósticos mais rápidos e precisos e o conhecimento sobre a avaliação do fluxo sanguíneo por modo Doppler ainda é limitado (PUGLIESI *et al.*, 2019).

Material e métodos

No presente estudo foram utilizadas 10 búfalas mestiças da raça Murrah x Mediterrâneo, oriundas do Biotério Unidade de Bubalinocultura Leiteira Eva Daher Abufaiad, localizado na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Os animais são criados em sistema extensivo, possuem água e sal mineral ad libitum e são previamente vacinados para brucelose e tuberculose.

A seleção dos animais foi realizada em decorrência de sua docilidade e pelo ECC entre 3 e 3,5. Para garantir a ciclicidade dos animais e ausência de anomalias reprodutivas, foi utilizada avaliação com ultrassonografia transretal. Após a avaliação as búfalas foram submetidas a IATF, com o protocolo Ovsynch.



A sincronização dos animais foi feita da seguinte forma: introdução de um implante de progesterona intravaginal e aplicação uma injeção intramuscular de benzoato de estradiol (BE) no dia inicial (D0). Após 9 dias (D9), o implante foi removido e em seguida foi aplicado novas injeções intramusculares contendo prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) e gonadotrofina coriônica equina (eCG). No 11º dia (D11), foi aplicado nova injeção intramuscular com GnRH. Após 16 horas a última administração, foi feita a inseminação (BARUSELLI *et al.*, 2013).

A avaliação por ultrassonografia modo doppler (Collor e spectral) teve início no 23º dia após a inseminação. O aparelho utilizado foi da marca Chison Eco Series Vet utilizando um transdutor linear com frequência de 4,2 Mhz para observar a perfusão e vascularização sanguínea corpo lúteo. As avaliações foram realizadas por um único avaliador.

A análise da funcionalidade do corpo lúteo foi mensurada pelo escore de vascularização central e periférica do tecido luteal, avaliado em uma escala de classificação de 0 a 4, para determinar a prenhez ou não. Animais de 0 – 1,9 (nenhuma ou baixa perfusão sanguínea) não prenhes e animais de 2 – 4 (moderada ou alta perfusão sanguínea) prenhes, segundo metodologia descrita por Pugliesi *et al.* (2017). O fluxo sanguíneo da artéria uterina foi avaliado por meio das mensurações dos parâmetros dopplervelocimétricos: índice de resistência (RI) e índice pulsatilidade (PI).

Aos 31 dias pós IATF, foi realizado a ultrassonografia B (convencional) com o mesmo aparelho, só que desta vez utilizando a frequência de 7,5 Mhz para observar a confirmação da prenhez nos cornos uterinos. O diagnóstico preditivo aos 23 dias pós IATF foi comparado ao resultado do diagnóstico definitivo aos 31 dias e os resultados foram classificados como verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso positivo (FP) e falso negativo (FN). Foram calculadas as taxas de sensibilidade por $VP/(VP + FN)$, especificidade por $VN/(FP + VN)$.

Resultados e discussão

O método de ultrassonografia modo Doppler, apresentou 66,66% de sensibilidade, de seis búfalas diagnosticadas como gestantes pelo modo B, quatro delas foram diagnosticadas perfeitamente pelo modo Doppler, uma vez que, o modo Doppler foi 50% mais específico nas quatro búfalas analisadas como não prenhas pelo modo B, somente duas fêmeas vieram a ser atestadas de maneira correta pelo modo Doppler, assim demonstrado nas tabelas 1, 2 e 3 abaixo.



Tabela 1 - Distribuição de búfalas diagnosticadas como gestantes (+) e não gestantes (-) na predição por ultrassonografia (US) modo Doppler colorido aos 23 dias e no diagnóstico confirmativo de gestação convencional aos 31 dias após a IATF.

ANIMAL	DOPPLER - 23 DIAS PÓS- IATF	MODO B - 31 DIAS PÓS- IATF
1	+	-
2	+	+
3	-	+
4	-	-
5	+	-
6	-	+
7	+	+
8	+	+
9	-	-
10	+	+

Tabela 2 - Frequência de resultados de búfalas gestantes e não gestantes pelo diagnóstico gestacional (DG) 23 dias pós- IATF por US modo Doppler pela avaliação de caract. luteais e DG convencional aos 31 dias pós-IATF por identificação de vesícula embrionária.

DG modo Doppler 23 dias pós IATF	DG convencional 31 dias PÓS-IATF		
	Gestante	Não gestante	Total
Gestante	4 (a)	2 (d)	6
Não gestante	2 (c)	2 (d)	4
Total	6 (a+c)	4 (b+d)	10

Sensibilidade: $([a/(a + c)] \times 100 = 66,66\%$; Especificidade: $([d/(b + d)] \times 100 = 50\%$; Acurácia: $(a + d)/(a+b+c+d) = 60\%$.

A acurácia do teste foi de 60%, valor abaixo dos estudos que tiveram resultados de 80 a 95% que por sua vez demonstram que a técnica pode ser viável pois não é invasiva, além de ser uma estratégia inovadora e de grande potencial (PUGLIESI et al., 2017). Silva *et al.*, (2018), realizaram diagnóstico gestacional precoce e encontraram sensibilidade de 100% e especificidade de 83,3%, valores também superiores daqueles encontrados em nosso estudo.



Tabela 3 - Parâmetros dopplervelocimétricos de búfalas gestantes e classificação de escore de vascularização do tecido luteal.

Identificação do animal	Diagnóstico Gestacional modo Doppler (23 dias)								DG. Modo B (30/35 dias)	
	Grau de vascularização								Confirmação Sim/Não	
	RI	PI	0	1	2	3	4	+ / -	Sim	Não
1	NEGA	0,57	0,71				x	+		-
2	ORGANELA	0,37	0,39				x	+	+	
3	JUMA			x				-	+	
4	PEROLA			x				-		-
5	JULIA	0,10	0,09				x	+		-
6	IVY				x			-	+	
7	OLINDA	0,12	0,23				x	+	+	
8	OLIVIA	1,62	4,91					x	+	+
9	OLYMPIA			x				-		-
10	INDIANA					x		+	+	

RI: Índice de resistência; PI: Índice de pulsatilidade.

Estudos recentes avaliaram a possibilidade de iniciar ressincronização após o diagnóstico precoce com Doppler em 165 receptoras de embrião aos 21 dias, objetivando melhorar o manejo reprodutivo em programas de transferência de embrião (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que os estudos citados foram na espécie bovina, que por sua vez apresentam período de gestação inferior (9 meses) aos animais da espécie bubalina (10 meses). Acreditamos que o período em que foi realizado a ultrassonografia (23 dias após a inseminação) seja muito precoce e os resultados falso-negativos tenham contribuído para a menor especificidade do teste. Outra razão para os baixos valores de sensibilidade são o número pequeno de animais que foram avaliados, para o sucesso do método é necessário difundir em um número maior de animais.

Figura 1 - Búfala diagnosticada como não gestante apresentando grau de vascularização 0 por meio de US modo Doppler.

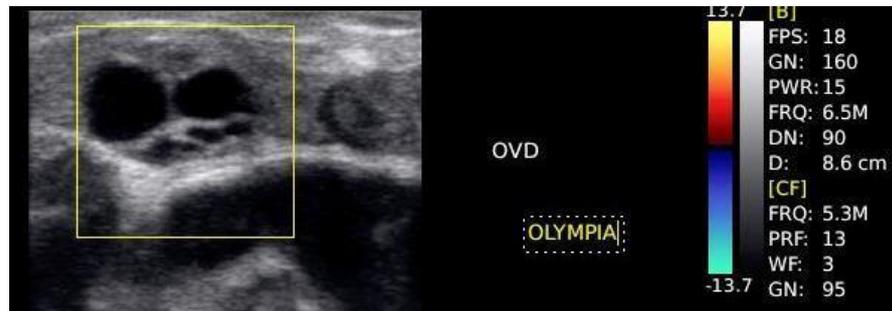
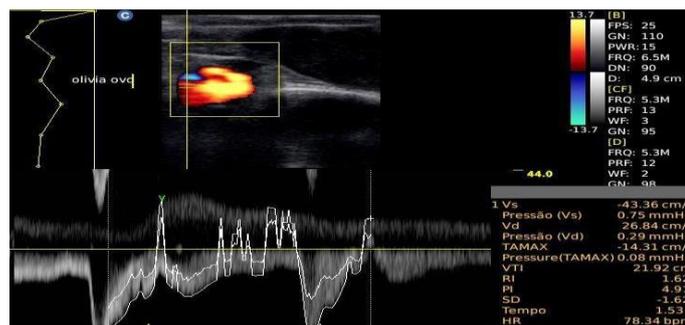


Figura 2 - Búfala diagnosticada como gestante apresentando grau de vascularização 4 por meio de US modo Doppler.



Conclusão

Este foi um estudo inovador, que até o momento não há relatos no Brasil, utilizando este método na espécie bubalina, sendo importante a compreensão do domínio e execução do procedimento. Todavia, os resultados encontrados no presente estudo caracterizaram a utilização da ultrassonografia modo Doppler em búfalas como um método que não apresentou alta eficiência na realização de diagnóstico gestacional precoce, mais estudos devem ser realizados na espécie para compreensão das características anatomofisiológicas, além da detecção do período ideal de realização da técnica para que resultados falso negativos não sejam notificados.

Referências

PALHÃO, M. P. et al. Efficacy and limitations of different approaches to anticipate the diagnosis of pregnancy in cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 6, p. 1909–1916, 2019.

SAMIR, H.; KANDIEL, M. M. M. Accuracy of subjective evaluation of luteal blood flow by color Doppler ultrasonography for early diagnosis of pregnancy in Egyptian buffalo. **Animal Reproduction Science**, v. 208, n. July, p. 106129, 2019.



HERZOG, K.; BOLLWEIN, H. Application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. SUPPL. 2, p. 51–58, 2007.

MELLO, R. R. C.; MOREIRA, E. M.; FERREIRA, J. E.; REIS, R. C S.; MELLO, M. R. B. Biotécnicas da reprodução aplicada aos bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Pubvet**, v. 12, n. 10, p. 1-16, 2018.

PUGLIESI, G. et al. Use of Doppler ultrasonography in timed-AI and ET programs in cattle. / Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 140–150, 2017.

PUGLIESI, G. et al. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 135, p. 73–79, 2019.

BARUSELLI, P. S. et al. Control of buffalo follicular dynamics for artificial insemination, superovulation and In Vitro embryo production. **Buffalo Bulletin**, v. 32, n. SPEC. ISSUE 1, p. 160–176, 2013.

SILVA, M. A. A. et al. Avaliação morfofuncional do corpo lúteo para diagnóstico precoce de gestação 20 dias após IATF em vacas mestiças leiteiras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 2006-2011, 2018.

GUIMARÃES, C. R. B. E. A. Corpus luteum blood flow evaluation on Day 21 to improve the management of embryo recipient herds. **Theriogenology**, v. 84, n. 2, p. 237-241, 2015.



EFEITO DA N-ACETILCISTEÍNA E TEOFILINA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ZIGOTOS OVINOS

EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE AND THEOPHYLLINE ON *IN VITRO* PRODUCTION OF SHEEP ZYGOTES

Jossimara de Melo SILVA^{1*}; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Beatriz Cavalcanti de FREITAS¹; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal – UNIVASF, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

*E-mail: jossimaramelosilva@gmail.com

Abstract

In order to evaluate the effect of N-acetylcysteine and theophylline on the *in vitro* production of sheep zygotes, ovaries were collected at a local slaughterhouse, which were then transported to the laboratory, where the oocytes were aspirated with a vacuum pump and taken to *in vitro* maturation, where they were divided into 5 groups: CON group, without the use of antioxidants; CIS group, using cysteamine as an antioxidant source; and groups NAC1, NAC1.5 and NAC2.0, where oocytes were matured in the presence of 1.0, 1.5 and 2.0 mM of N-acetylcysteine, respectively, as an antioxidant source. Subsequently, the best IVM group oocytes were destined for *in vitro* fertilization, where they were included together with the selected spermatozoa, in drops containing IVF medium and were divided into the following groups: CON group, without the use of capacitors; HEP group, supplemented with 1 mg/mL heparin as an enabling agent; and the groups TEO2.5, TEO5 and TEO10, using theophylline at concentrations of 2.5, 5.0 and 10.0 mM, respectively. Data were presented in percentage and the chi-square test was used in Epi Info software. Results were considered significant when $P < 0.05$. Regarding cumulus cell expansion, all treatment groups tested in the IVM achieved 100% expansion. Regarding the degrees of expansion, the NAC 1.5 group presented a greater amount of oocytes with a degree of total expansion, while the NAC 2.0 group presented a greater number of oocytes with a degree of slight expansion. Regarding *in vitro* fertilization, observing the number of cleaved structures of the CON, HEP, TEO2.5, TEO5.0 and TEO10.0 treatment groups, it was not possible to observe a significant difference. With this, it was possible to conclude that N-acetylcysteine can be seen as a possible antioxidant option to be used in the *in vitro* maturation of sheep oocytes. Regarding *in vitro* fertilization, although theophylline has not been shown to be superior to the control group and heparin, it may become a possible alternative as an enabling agent. However, more studies need to be carried out in order to assess the real need for supplementation with capacitating agents for sheep sperm.

Keywords: Antioxidant, Embryo, IVP, Methylxanthine.

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica reprodutiva bastante utilizada, sendo as principais etapas envolvidas a colheita, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos, além do



cultivo *in vitro* de embriões (BALDASSARRE, 2008). Um dos aspectos que influencia o sucesso da PIV ovina é a composição do meio de maturação *in vitro* (MIV). Um importante componente do meio MIV é o antioxidante, que tem a função de controlar a alta produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar estresse oxidativo, reduzindo a qualidade do oócito, afetando, assim, o processo da MIV (PANCARCI *et al.*, 2012). Um exemplo de antioxidante que vem sendo utilizado atualmente é a N-acetilcisteína (NAC), que, ao ser adicionada no meio de maturação, gerou efeito benéfico em oócitos suínos em desenvolvimento (WHITAKER; CASEY; TAUPIER, 2012).

Outra etapa extremamente importante durante a PIV é a fecundação *in vitro* (FIV). Os espermatozoides, quando ejaculados, ainda não são capazes de fecundar os oócitos, pois precisam passar pela capacitação espermática e a reação acrossômica (HAFEZ; HAFEZ, 2004). As metilxantinas são um exemplo de substâncias que desencadeiam a capacitação espermática, através da inibição competitiva da fosfodiesterase (PDE). A teofilina é uma metilxantina, que pode aumentar a capacidade dos espermatozoides em se ligar a oócitos maturados *in vitro*, tanto na espécie bovina (TAKAHASHI; FIRST, 1993) quanto na espécie suína (YOSHIOKA *et al.*, 2003). O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da N-acetilcisteína e teofilina na produção *in vitro* de zigos ovinos.

Material e Métodos

Para a colheita dos oócitos, foram utilizados ovários ovinos, obtidos de abatedouro local, utilizando uma bomba de vácuo. Logo após a colheita, os CCO foram selecionados e levados à maturação *in vitro* (MIV), sendo divididos em cinco grupos de maturação: grupo CON, composto de TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina B, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino, 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 UI/mL de eCG e 1 µg/mL de estradiol; grupo CIS, no qual os oócitos foram maturados no mesmo meio do grupo CON, suplementado com cisteamina; e os grupos NAC1, NAC1,5 e NAC2,0, nos quais foi utilizado o mesmo meio do grupo CON, suplementado com 1,0; 1,5 e 2,0 mM de N-acetilcisteína, respectivamente. As gotas de MIV foram cobertas com óleo mineral e os oócitos foram incubados durante 24 horas, a 38,5°C e 5% de CO₂. Ao final do processo de maturação, foi estimado o grau de expansão das células do cumulus dos oócitos, classificando-os em: total, moderado e leve, conforme a metodologia de Aghaz *et al.* (2015).



Para fecundação *in vitro*, foi utilizado sêmen fresco, colhido por vagina artificial. Em seguida, foram selecionados os melhores espermatozoides pelo método de gradiente descontínuo de Percoll 45%/90%. A concentração final foi de 1×10^6 espermatozoides/mL, no volume total de 50 μ L/gota de meio FIV (SOF®, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 μ g de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro e 10 μ g/mL de hipotaurina), sob óleo mineral, nas mesmas condições da MIV. Os oócitos maturados com 1,5 mM de N-acetilcisteína foram destinados à FIV, sendo redistribuídos, juntamente com os espermatozoides selecionados, nos seguintes grupos: grupo CON, composto por meio FIV (descrito acima); grupo HEP, composto pelo mesmo meio do grupo CON, suplementado com 1 mg/mL de heparina; e os grupos TEO 2,5, TEO 5 e TEO 10, composto pelo mesmo meio do grupo CON, suplementado com 2,5; 5,0 e 10,0 mM de teofilina, respectivamente. Os presumíveis zigotos foram desnudados através de sucessivas pipetagens e submetidos ao cultivo *in vitro* por 48 h em meio SOF, suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina, nas mesmas condições da MIV e FIV. O número de estruturas clivadas foi registrado no fim do período de cultivo. Os dados foram apresentados em porcentagem e avaliados usando o teste de Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

Com relação à expansão das células do cumulus, todos os grupos apresentaram expansão. Em relação ao grau de expansão total, o grupo NAC1,5 apresentou um maior número de oócitos que atingiram uma total expansão das células do cumulus (Tabela 1), sendo significativamente maior que os dos grupos CON e NAC2,0 ($P < 0,05$), não diferindo dos grupos CIS e NAC1,0. Já em relação ao grau de expansão moderado, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos de tratamentos testados (Tabela 1).

Tabela 1 – Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* sem a presença de antioxidantes (CON), na presença de cisteamina (CIS) ou de N-acetilcisteína (NAC1,0; NAC1,5; NAC2,0).

Grupos	Nº de CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)		
			Total	Moderado	Leve
CON	60	100 (60/60)	20,0 (12/60) BCb	25,0 (15/60) Ab	55,0 (33/60) ABa
CIS	60	100 (60/60)	33,3 (20/60) ABab	23,3 (14/60) Ab	43,3 (26/60) ABa



NAC		100 (60/60)	28,3 (17/60) <small>Aba</small>	31,6 (19/60) <small>Aa</small>	40,0 (24/60) <small>Ba</small>
1,0	60				
NAC		100 (60/60)	38,3 (23/60) <small>Aa</small>	25,0 (15/60) <small>Aa</small>	38,3 (23/60) <small>Ba</small>
1,5	60				
NAC		100 (60/60)	8,3 (5/60) <small>Cc</small>	31,6 (19/60) <small>Ab</small>	60,0 (36/60) <small>Aa</small>
2,0	60				

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma coluna ($P < 0,05$). ^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma linha ($P < 0,05$).

Uma possível explicação para os resultados encontrados em relação à expansão das células do cumulus, em que todos os grupos atingiram 100% de expansão, é que, talvez, o oócito ovino não seja tão exigente em relação ao uso de antioxidantes. Hu *et al.* (2016) relataram que a concentração de NAC precisa ser superior a 1,0 mM para remover efetivamente as espécies reativas de oxigênio. Nesse sentido, as concentrações mais comumente utilizadas em meios de cultivo de células estão na faixa de 1 a 10 mM. A utilização de 1,5 mM de NAC pode auxiliar no fornecimento de um ambiente favorável para o oócito e células do cumulus (HUNTER, 2000). Assim, pode-se dizer que a suplementação com NAC no meio MIV pode combater os efeitos nocivos das ERO e melhorar a qualidade dos oócitos (YUE *et al.*, 2016).

Com relação à fecundação *in vitro*, observando o número de estruturas clivadas oriundas dos grupos de tratamento não foi possível observar diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 2 – Número de estruturas clivadas (%) após fecundação *in vitro* de oócitos sem a presença de agentes capacitantes (CON), com heparina (HEP) e na presença de teofilina (TEO2,5; TEO5,0 e TEO10,0).

Tratamentos	Oócitos fecundados	Estruturas clivadas % (n)
CON	55	58,2 (32/55)
HEP	55	56,7 (31/55)
TEO2,5	55	49,1 (27/55)
TEO5,0	55	50,1 (28/55)
TEO10,0	55	47,3 (26/55)

$P > 0,05$.

Apesar de, no presente trabalho, a teofilina não ter apresentado resultados superiores aos grupos CON e HEP, essa substância produziu resultados satisfatórios em bovinos, quando Takahashi e First (1993), ao estudarem diferentes concentrações de teofilina, obtiveram melhores



taxas de produção com a concentração de 2,5 e 5,0 mM, e concluíram que essas concentrações aumentaram a capacidade fecundante dos espermatozoides.

Os resultados de FIV do trabalho mostraram que todos os grupos de tratamento testados na FIV não diferiram entre si em relação ao número de clivagens. A explicação para esse resultado é que, no protocolo do nosso grupo de pesquisa, todos os grupos de tratamento tinham substâncias que podem ter influenciado na capacitação espermática e, conseqüentemente, na formação de clivagens, como o soro de ovelha em estro (SOE) e a hipotaurina.

Conclusão

Com isso, pode-se concluir que a N-acetilcisteína é uma possível opção de antioxidante a ser utilizado na maturação *in vitro* de oócitos ovinos, se tornando uma alternativa para substituir a cisteamina e, na fecundação *in vitro*, apesar da teofilina não ter se mostrado superior ao grupo controle e heparina, ela pode ser tornar uma possível alternativa de agente capacitante. Porém, mais estudos necessitam ser realizados, afim de avaliar a real necessidade de suplementação com agentes capacitantes para espermatozoides ovinos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Referências

- AGHAZ, F. H.; HAJARIAN, H.; SHABANKAREH, K.; ABDOLMOHAMMADI, A. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. **Theriogenology**, v. 84, p.1631-1635, 2015
- BALDASSARRE, H. Tecnologias reprodutivas de última geração. In: Aisen EG. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet, p.179-183, 2008.
- HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. Barueri: Manole, p. 509, 2004.
- HU, J. J.; WONG, N. K.; LU, M. Y.; CHEN, X.; YE, S.; ZHAO, A. Q.; GAO, P.; YITSUN KAO, R.; SHEN, J.; YANG, D. HKOCl-3: A fluorescent hypochlorous acid probe for live-cell and imaging and quantitative application in flow cytometry and a 96-well microplate assay. **Chemical Science**, v. 7, p. 2094–2099, 2016.
- HUNTER, M. G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 122–13, 2000.



PANCARCI, S. M.; ARI, U. Ç.; ATAKISI, O.; GÜNGÖR, O.; ÇIGREMİS, Y.; BOLLWEIN, H.; Nitric oxide concentrations, estradiol-17 beta progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p. 9-15, 2012.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. *In vitro* fertilization of bovine oocytes in the presence of theophylline. **Animal Reproduction Science**, v.34, p.1-18, 1993.

WHITAKER, B.D.; CASEY, S.J.; TAUPIER, R. The effects of N-acetyl-L-cysteine supplementation on *in vitro* porcine oocyte maturation and subsequent fertilization and embryonic development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, p. 1048- 1054, 2012.

YOSHIOKA, K.; SUZUKI, C.; ITOH, S. et al. Production of piglets derived from *in vitro* produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization. **Biology of Reproduction**, v.69, p.2092-2099, 2003.

YUE, S.L.; ZHANG, Y.T.; WANG, S.W.; SUN, M.; XING, Y.C.; WEN, J.; ZHOU, J.B. Effect of NAC on mouse GV oocyte survival and subsequent embryonic development following vitrification. College of Life Science, Northeast Agricultural University. **Cryo Letters**, v.37, p.295–302, 2016.



EFEITO DA ADIÇÃO DE SELENITO DE SÓDIO AO DILUENTE TRIS-GEMA SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA E ACROSSOMAL DE SÊMEN OVINO CONGELADO-DESCONGELADO

EFFECT OF ADDITION OF SODIUM SELENITE TO TRIS-YOLK DILUENT ON PLASMA AND ACROSOMAL MEMBRANE INTEGRITY OF FROZEN-THAWED SHEEP SEMEN

Beatriz Cavalcanti de FREITAS^{1*}; Paulo Ricardo Vieira da SILVA¹; Lucas Dias Rodrigues MARQUES¹; Illa Carla Santos CARVALHO²; Elenice Andrade MORAES²; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹.

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal – UNIVASF, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

²Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre – UNIVASF, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

*E-mail:beatrizcfreitas2@hotmail.com

Abstract

Cryopreservation has numerous advantages for the semen conservation of production animals, such as sheep. However, oxidative stress during the storage process can cause irreversible damage to sperm cells. Thus, it is necessary to identify substances with cryoprotective and antioxidant characteristics that can be used to balance the action of oxidants produced during conservation procedures. In this sense, sodium selenite (SS) could constitute an antioxidant additive to sheep semen extenders. This is because selenite is a structural component of selenoproteins, many of them with antioxidant activity, such as glutathione peroxidase (GPx). Thus, the objective of the present work was to evaluate the efficiency of the addition of sodium selenite to the extender based on TRIS - yolk in the cryopreservation of semen from Santa Inês sheep. For that, 10 ejaculates were collected from three rams (10 ejaculates/ram), using an artificial vagina. The ejaculates were diluted with TRIS-egg yolk and organized into the following treatments: Group CON, where the diluent did not contain SS; in addition to groups SS2, SS4 and SS6, where 2 µg/mL, 4 µg/mL and 6 µg/mL of SS were added to the diluent, respectively. After the addition, the diluted samples were placed in a cold chamber at 5°C for 2 h. Then, the samples were placed in 0.5 mL straws, sealed, placed for 15 minutes under vapors of liquid nitrogen at 5 cm from the liquid slide and, at the end of this time, they were immersed in liquid nitrogen. Thawing was performed at 37°C for 30s. Samples were analyzed for plasma and acrosomal membrane integrity. The results are expressed as mean ± standard error (P < 0.05), ANOVA was used, followed by Tukey's test, using the R software. The use of 2 µg/mL of SS was shown to improve the acrosomal integrity (81.09) in relation to the other treatments. However, no significant differences were found for the assessment of plasma membrane integrity. This finding can be explained by a possible increase in the activity of the GSH-Px enzyme, providing greater protection to sperm against oxidative damage and preventing the formation of free radicals. In conclusion, the inclusion of sodium selenite provided a beneficial effect on the mitochondrial activity of frozen-thawed sheep semen. However, more conclusive research is needed to define its ideal concentration for sheep semen conservation.

Keywords: Antioxidant, Cryopreservation, Sperm.

Introdução



A ovinocultura vem crescendo em todo o Nordeste, seja pela produção de carne, leite ou pele, que, associados ou não, contribuem para o desenvolvimento econômico da região (EMBRAPA, 2017). Nesse contexto, as biotécnicas reprodutivas, como a Inseminação Artificial (IA), são ferramentas que possibilitam avanços no melhoramento genético dos rebanhos (ALLAI *et al.*, 2018). Apesar das taxas de prenhez aceitáveis após uso do sêmen ovino fresco para inseminação artificial, ainda é curta a sobrevivência dos espermatozoides ovinos, bem como é limitado o número de doses de sêmen que pode ser obtido por carneiro (CÂMARA; GUERRA, 2011). Uma das alternativas seria o uso do sêmen refrigerado ou congelado-descongelado. Entretanto, o estresse oxidativo durante o processo de crio-armazenamento pode causar injúrias à célula espermática que, em alguns casos, podem ser irreversíveis (ALLAI *et al.*, 2018). Nesse contexto, a prática do uso de substâncias antioxidantes, adicionadas a diluentes de sêmen, tem sido utilizada em várias espécies. Nesse sentido, o selenito de sódio poderia constituir uma fonte alternativa de antioxidante, a ser utilizado na conservação do sêmen ovino. Isso porque o selênio participa ativamente nas defesas celulares, atuando como um componente estrutural das selenoproteínas, muitas delas com atividade antioxidantes, como a família da glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxRs) (LIZARRAGA *et al.*, 2019). Vale ressaltar que não há estudos sobre o uso de selenito de sódio na composição de diluentes seminais nas diferentes espécies, incluindo os ovinos. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência da adição de SS ao diluente a base de TRIS-gema na criopreservação de sêmen de ovinos, o que poderia representar uma fonte alternativa e promissora para o aumento da viabilidade da célula espermática sob criopreservação, permitindo maior utilização e difusão da IA em programas de reprodução assistida nesta espécie.

Material e métodos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA, sob o número de protocolo 0002/310122. Foram colhidos 10 ejaculados de três carneiros Santa Inês (10 ejaculados/carneiro), utilizando uma vagina artificial. Os ejaculados foram diluídos com TRIS-gema de ovo e organizados nos seguintes tratamentos: grupo CON, onde o diluidor não possuía SS; além dos grupos SS2, SS4 e SS6, onde foi acrescentado ao diluidor, 2 µg/mL, 4 µg/mL e 6 µg/mL de SS, respectivamente. Após a adição, as amostras diluídas foram acondicionadas em câmara fria, a 5°C, por 2 h. Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL,



seladas, colocadas por 15 minutos sob vapores do nitrogênio líquido a 5 cm da lâmina líquida e, ao final deste tempo, foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico por, no mínimo, 30 dias. Em seguida, o descongelamento foi procedido a 37°C, por 30s, em banho-maria. A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides congelados-descongelados foi determinada pelo teste com sonda fluorescente, conforme metodologia de Graham, Kunze e Hammerstedt (1990). Para esta avaliação, utilizou-se a associação de duas sondas fluorescentes, ou seja, o iodeto de propídio (IP) e Hoechst 33342 (H33342), onde os espermatozoides com membrana plasmática lesionada apresentavam o núcleo corado de rosa, enquanto os de membrana plasmática intacta mostravam o núcleo corado de azul. A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando o fluorocromo (isoticianato de fluoresceína - FITC), conjugado a uma lecitina (peanut agglutinin – PNA) e associado a um fluorocromo que tem afinidade pelo DNA (iodeto de propídeo - IP) (CASEY *et al.*, 1993). Esta técnica permite distinguir os espermatozoides vivos e/ou mortos com acrossoma intacto ou reagido. Para a análise dos dados, foram utilizadas as médias dos valores obtidos nas coletas de cada tratamento. As variáveis foram analisadas quanto à distribuição normal e homogeneidade de variâncias pelo método Kolmogorov-Smirnov, sendo utilizada a ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, empregando-se o software R. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Em relação à integridade da membrana plasmática, não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de selenito de sódio no sêmen congelado-descongelado (Tabela 1; $p < 0,05$). Com relação à integridade acrossomal, a adição de 2 $\mu\text{g/mL}$ de selenito (SS2) de sódio proporcionou um maior percentual de espermatozoides com o acrossoma íntegro do que nos demais tratamentos (Tabela 1; $p < 0,05$).

O processo de diluição e criopreservação efetuado não causou danos às membranas de uma grande proporção de espermatozoides nos diferentes tratamentos avaliados, de modo que a utilização das diferentes concentrações de selenito de sódio não apresentou diferenças significativas, como demonstrado na Tabela 1.

Estes resultados são similares aos descritos por Santana *et al.* (2020) e Arruda *et al.* (2018), os quais não observaram diferenças significativas quando foi adicionado 10.000 μM de ácido fólico e de 1 nM, 10 nM, 100 nM e 1000 nM de miricetina ao diluidor, respectivamente.



Tabela 1 – Integridade da membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAC) de espermatozoides congelados-descongelados de ovinos após a adição de 2 µg/mL (SS2), 4 µg/mL (SS4) e 6 µg/mL (SS66) ou não (SS0) de selenito de sódio no sêmen diluído.

Concentrações de Selenito de Sódio	Imp	iAC
SS0	29,56 ± 2,09 ^A	74,50 ± 1,54 ^B
SS2	30,18 ± 2,64 ^A	81,09 ± 1,31 ^A
SS4	25,22 ± 2,00 ^A	74,31 ± 1,72 ^B
SS6	29,50 ± 2,75 ^A	65,83 ± 2,84 ^C

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma linha ($p < 0,05$).

O fator que pode ter interferido na não observação das ações antioxidativas da inclusão do selenito de sódio ao meio diluente é o fato de se ter trabalhado com sêmen de alta qualidade e poucas patologias espermáticas, provenientes de carneiros em adequadas condições de saúde, pois, de acordo com Castro (2010), a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) acontece de maneira mais evidenciada quando ocorre grande quantidade de espermatozoides com gota citoplasmática e/ou uma grande quantidade de leucócitos no ejaculado.

Nesse estudo, observou-se que o percentual da integridade acrossomal dos espermatozoides que receberam adição de 2 µg/mL de selenito de sódio, foi mais elevado em relação aos demais tratamentos. Esse achado pode ser elucidado, de maneira que o selenito de sódio participa da defesa contra o estresse oxidativo nas células, desintoxicando e inibindo a formação de hidroperóxidos lipídicos, sendo um oligoelemento com atividade antioxidante que desempenha funções essenciais para prevenir o dano celular (MAHMOUD; ABDEL-RAHEEM; HUSSEIN, 2013). A principal função do selênio no organismo é como um componente de várias enzimas selenoproteicas (SILVA; QUIROGA; AUZA, 2000).

Conclusão

Com isso, pode-se concluir que o selenito de sódio é uma possível opção de antioxidante a ser utilizado como aditivo a diluentes para sêmen ovino. No entanto, novas pesquisas são necessárias para melhor validar a sua utilização e concentração ideal de uso.

Agradecimentos



À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA) e ao Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestre (CPSENS).

Referências

- ALLAI, L.; BENMOULA, A.; MARCIANE DA SILVA, M.; NASSER, B.; EL AMIRI, B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science.**, v. 192, p.6-17, 2018.
- ARRUDA, L.C.P.; SILVA, R.A.J. Araújo; MONTEIRO, M.M.; SILVA, R.P.F.; OLIVEIRA, A.s.; MERGULHÃO, F.C.C.; MONTEIRO JUNIOR, P.L.J.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P.. Avaliação *in vitro* do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S.L.], v. 70, n. 1, p. 153-159, jan. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9671>.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n.1, p. 33-40, 2011. Disponível em: www.cbra.org.br. Acesso em: 22 set. 2022.
- CASEY P. J. HILLMAN R. B. ROBERTSON K. R. YUDIN A. I. LIU I. K. M. DROBINS E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14 p. 289-297. 1993.
- CASTRO, S. R. S. **Uso de antioxidantes para elevação da qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*)**. Orientador: Alexandre Rossetto Garcia. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA, 2010. Disponível em:http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/5311/1/Dissertacao_UsoAntioxidantesElevacao.pdf. Acesso em: 22 set. 2022
- EMBRAPA. **Pesquisa Pecuária Municipal 2020: rebanhos de caprinos e ovinos**. 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227322/1/CNPC-2021-Art-boletimCIM-16.pdf>. Acesso em: 22 set. 2022.
- GRAHAM J. K.; KUNZE E. HAMMERSTEDT R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p. 55-64. 1990.
- LIZARRAGA R. M.; ANCHORDOGUY, J. M.; GALARZA, E. M. FARNETANO, N.A.; CARRANZA-MARTIN, A.; FURNUS, C.C.; MATTIOLI, G.A.; ANCHORDOQUY, J.P. Sodium selenite improves *in vitro* maturation of *Bos primigenius taurus* oocytes. **Biological Trace Element Research**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01966-2>.



MAHMOUD, G. B.; ABDEL-RAHEEM, S. M.; HUSSEIN, H. A. Effect of combination of vitamin E and selenium injections on reproductive performance and blood parameters of Ossimi rams. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 103-108, 2013.

SANTANA, M. V.; BARROS, F. N.; BRANCO, M. A. C.; JÚNIOR, S. H. C.; CORDEIRO, M. L. L.; SILVA, J. H. L.; SOUZA, J. A. T. Análises de membrana plasmática, acrossoma e mitocôndria de espermatozoides ovino após criopreservação com adição do ácido fólico no meio tris-gema. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 30, n. 4, p. 307-311, 2020.

SILVA, J.; QUIROGA, H.M.; AUZA J.A.N. Selenio en el rumiante. Relaciones suelo, planta, animal. **Medicina Veterinária**, v. 17, p. 229-246, 2000.



EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE TATU-PEBA UTILIZANDO CRIOPROTETORES INTRACELULARES E EXTRACELULARES

EFFECT OF CRYOPRESERVATION OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM SIX-BANDED ARMADILLOS USING INTRACELLULAR AND EXTRACELLULAR CRYOPROTECTANTS

João Vitor da Silva VIANA^{1*}; Denilsa Pires FERNANDES¹; Érika Almeida PRAXEDES¹; Maria Valéria de Oliveira SANTOS¹; Carlos Iberê Alves FREITAS²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Laboratório de Estudos em Imunologia e Animais Silvestres, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

*joaovitorvianajr@gmail.com

Resumo

Euphractus sexcinctus é uma das espécies de tatus encontradas no Brasil com grande importância ecológica e econômica. Contudo, a espécie sofre redução populacional em virtude de atividades antrópicas. Metodologias voltadas para sua conservação são importantes e podem ser implementadas, como a criação de criobancos, desenvolvendo um protocolo de criopreservação eficaz. Assim, o estudo objetivou criopreservar células somáticas de tatu-peba utilizando uma combinação de 10% de dimetilsulfóxido e 0,2 M de sacarose. Para tanto, cinco animais foram anestesiados e submetidos a biópsias de pele para obtenção de fragmentos, os quais foram cultivados *in vitro* e as células recuperadas. Na quarta passagem, as células foram criopreservadas e analisadas antes e após a criopreservação quanto à viabilidade com corante azul de tripan, atividade metabólica pelo ensaio de MTT, tempo de duplicação populacional e níveis apoptóticos. Os resultados demonstraram a eficiência da solução crioprotetora e, consequentemente, do protocolo de criopreservação, onde se obteve uma viabilidade superior a 90%, alta atividade metabólica (>80%) e índice de células necróticas inferior a 6%. Portanto, este protocolo promove a conservação da qualidade de células somáticas de tatu-peba.

Palavras-chave: Xenartra, congelamento lento, recursos somáticos.

Abstract

Euphractus sexcinctus is one of the armadillos species in Brazil with great ecological and economic importance. Nevertheless, the suffering species reduced due to anthropic activities. Methodologies aimed at their conservation are important and can be implemented, such as the creation of cryobanks, developing an effective cryopreservation protocol. Therefore, the study aimed to cryopreserve somatic cells of six-banded armadillos using a combination of 10% dimethyl sulfoxide and 0.2 M sucrose. Then, five animals were anesthetized and submitted to skin biopsies to obtain fragments, which were cultured *in vitro*, and the cells recovered. In the fourth passage, cells were cryopreserved and analyzed before and after cryopreservation for viability with trypan blue dye, metabolic activity by MTT assay, population doubling time and apoptotic levels. The results demonstrated the efficiency of the cryoprotectant solution and, consequently, of the cryopreservation protocol, which obtained a viability greater than 90%, high metabolic activity



(>80%) and a necrotic cell index below 6%. Therefore, this protocol promotes the conservation of the quality of six-banded armadillo somatic cells.

Keywords: Xenarthra, slow freezing, somatic resources.

Introdução

O *Euphractus sexcinctus* é uma das espécies silvestres que ocorrem nos biomas brasileiros. Popularmente, a espécie é conhecida por tatu-peba e integra a superordem Xenarthra. Esta espécie desempenha um papel importante na dispersão de sementes, bem como tem sido empregado como um modelo experimental. Associada à sua importância, e em virtude da sua diminuição populacional, é relevante o desenvolvimento de métodos de conservação, como a formação de criobancos, visando seu uso em clonagem reprodutiva e indução de células à pluripotência.

Em geral, uma variabilidade na eficiência da criopreservação tem sido observada e justificada pelas características espécie-específicas, além dos possíveis danos decorrentes das baixas temperaturas que as amostras são submetidas (BORGES *et al.*, 2020), sendo a escolha dos crioprotetores uma etapa essencial para a garantia da eficiência do processo. Dentre os protocolos utilizados em diferentes espécies, aqueles empregando a combinação de crioprotetores intra e extracelulares têm-se destacado em virtude da otimização da concentração dos crioprotetores e manutenção da viabilidade celular (MURRAY; GIBSON, 2022).

Portanto, o objetivo foi avaliar os efeitos da combinação de crioprotetor intracelular e extracelular na criopreservação de células somáticas de *E. sexcinctus* sobre a viabilidade, metabolismo, tempo de duplicação e níveis apoptóticos.

Material e métodos

Um total de cinco animais foram anestesiados e amostras da pele auricular foram recuperadas (CEUA/UFERSA, no. 36/2020 e ICMBio, no. 76655-1). No laboratório, após a fragmentação (9,0 mm³) das amostras, fragmentos foram cultivados em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos-antimicóticos, à 38,5°C e 5% de CO₂. Posteriormente, células na quarta passagem foram criopreservadas por congelamento lento, na presença da solução crioprotetora composta por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 10% de SFB e 0,2 M de sacarose (SAC). Após duas semanas, amostras foram descongeladas, cultivadas *in vitro* e após atingirem 70–80% de confluência foram submetidas às análises de viabilidade, metabolismo, tempo de duplicação e níveis de apoptose.



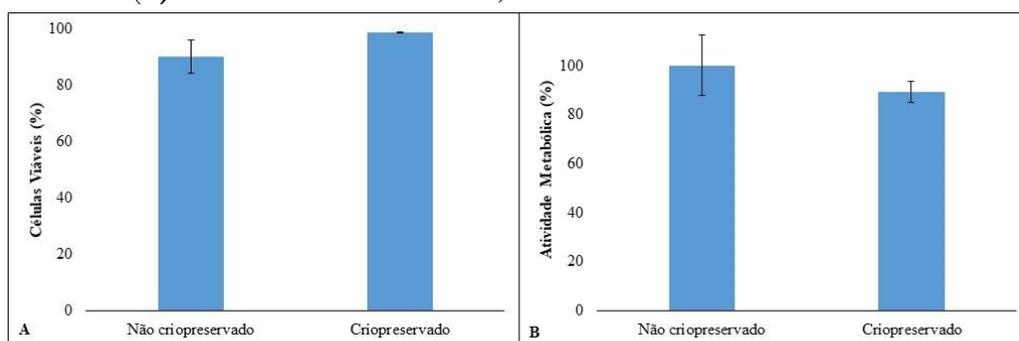
Para a análise da viabilidade celular, células foram expostas ao corante azul de tripan a 0,04%, onde foi avaliado a integridade da membrana plasmática por meio da penetração do corante, onde células viáveis apresentaram coloração translúcida e células inviáveis, coloração azul. Para avaliação do metabolismo celular, foi realizado o ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), onde as amostras foram incubadas com a solução de MTT (5 mg/mL em PBS) por 3 h a 38,5°C, posteriormente, foi acrescido DMSO, como solução de solubilização do MTT, e a leitura foi realizada a 595 nm. Para determinação do tempo de duplicação celular, células foram cultivadas em placas de 24 poços e realizada a contagem a cada 24 h por 7 dias, sendo o tempo de duplicação determinado por meio da fórmula $PDT = T \ln 2 / \ln (X_f / X_i)$. Para a avaliação dos níveis apoptóticos, células foram submetidas aos marcadores laranja de acridina e brometo de etídio e avaliadas sob microscópio de fluorescência, onde as células consideradas viáveis apresentaram núcleo verde claro uniforme, células em apoptose precoce ou inicial apresentaram núcleo verde não uniforme, células em apoptose tardia apresentaram áreas alaranjadas brilhantes e as células necróticas apresentaram núcleo laranja uniforme.

Finalmente, os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados quanto à normalidade e homocedasticidade pelo teste de Shapiro-Wilk e Levene's, respectivamente. Os dados não mostraram distribuição normal e foram transformados em arco-seno e submetidos a ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Resultados e discussão

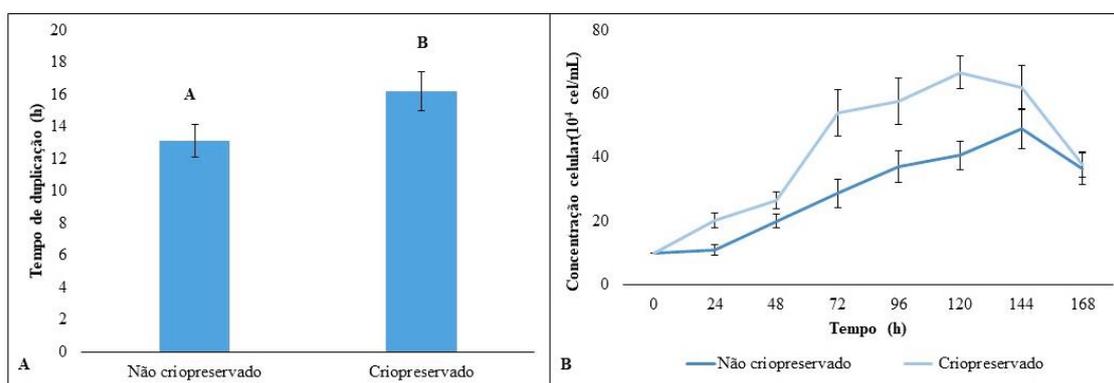
Não foi observada diferença quanto à viabilidade das células entre os grupos criopreservados e não criopreservados, tendo $90,2\% \pm 5,9$ e $98,7\% \pm 0,3$, respectivamente (Fig. 1A).

Figura 1 - Viabilidade e atividade metabólica de células de *E. sexvinctus* antes e após a criopreservação. (A) Viabilidade celular. (B) Atividade metabólica. $P > 0,05$.



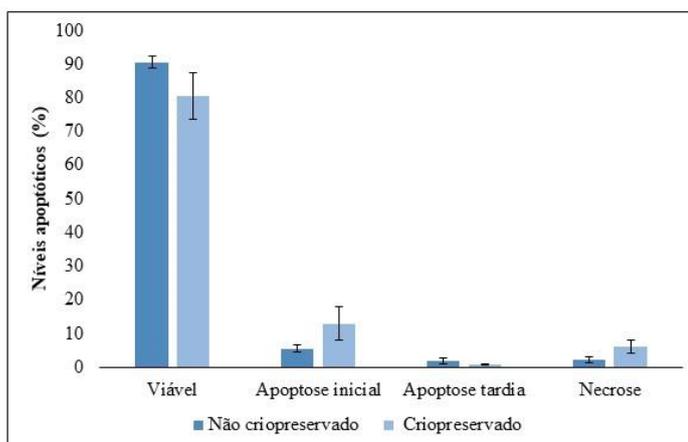
Do mesmo modo, os grupos não apresentaram divergências quanto ao metabolismo celular, onde foi mantida atividade metabólica acima de 80% no grupo de células criopreservadas ($89,3\% \pm 4,4$; Fig. 1B). Por outro lado, houve um aumento no tempo de duplicação após o processo de criopreservação ($16,2 \text{ h} \pm 1,2$; Fig. 2A) quando comparada às células não criopreservadas ($13,1 \text{ h} \pm 1,0$). A atividade proliferativa de ambos os grupos também pode ser observada a partir da curva de crescimento na Fig. 2B, onde foram observadas todas as fases do ciclo celular: adaptação, crescimento, estacionária e declínio celular.

Figura 2 - Determinação do tempo de duplicação e curva de crescimento de células de *E. sexcinctus* antes e após a criopreservação. ^{AB}: $P < 0,05$.



Quanto aos níveis apoptóticos (Fig. 3), ambos os grupos criopreservados e não criopreservados apresentaram alta porcentagem de células viáveis com valores acima de 80%, sendo observadas poucas células em apoptose, tanto inicial quanto tardia e, conseqüentemente, um reduzido percentual de células em necrose. Esse resultado demonstra a eficiência da técnica na manutenção da viabilidade dessas células.

Figura 3 - Níveis apoptóticos de células de *E. sexcinctus* antes e após a criopreservação. $P > 0,05$.



Tais resultados corroboram com estudos anteriores em outras espécies [*Dasyprocta leporina*: PRAXEDES *et al.* (2021); *Panthera onca*: OLIVEIRA *et al.* (2021)] que demonstraram o efeito positivo da utilização da combinação de crioprotetores intra e extracelulares, promovendo a manutenção da viabilidade e metabolismo celular. Além disso, a diminuição gradual da temperatura e desidratação podem afetar as células de diferentes formas, uma delas é o aumento das espécies reativas de oxigênio, tais radicais livres afetam às células negativamente (LEN *et al.*, 2019) podendo aumentar seu tempo de duplicação da população, como foi observado no grupo das células criopreservadas.

Conclusão

O protocolo de criopreservação para células somáticas de *E. sexcinctus* permitiu a manutenção da sua viabilidade, atividade metabólica e uma baixa porcentagem de células necróticas, possibilitando que as células sejam armazenadas por longos períodos e viabilizando seu uso em biotecnologias para a espécie, tais como a clonagem por transferência nuclear.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).



Referências

BORGES, A.A.; LIRA, G.P.O.; NASCIMENTO, L.E.; SANTOS, M.V.O.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R.; PEREIRA, A.F. Isolation, characterization, and cryopreservation of *collared peccary* skin-derived fibroblast cell lines. **PeerJ**, v. 8, p. e9136, 2020.

LEN, J.S.; KOH, W.S.D.; TAN, S. The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. **Bioscience Reports**, v.39, p. BSR20191601, 2019.

MURRAY, K.A.; GIBSON, M.I. Chemical approaches to cryopreservation. **Nature**, v. 6, p. 02-15, 2022.

OLIVEIRA, L.R.M.; PRAXEDES, E.A.; SILVA, M.B.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, H.V.R.; PEREIRA, A.F. Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 93, p. e00927, 2021.

PRAXEDES, E.A.; SILVA, M.B.; OLIVEIRA, L.R.M.; VIANA, J.V.S.; SILVA, A.R.; OLIVEIRA, M.F.; PEREIRA, A.F. Establishment, characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758): A study in a wild rodent. **Cryobiology**, v. 98, p. 63–72, 2021.



**EFEITO DA EXPRESSÃO DO ESTRO SOBRE OS PARÂMETROS
MORFOLÓGICOS FOLICULARES EM FÊMEAS BOVINAS INSEMINADAS EM
TEMPO FIXO**

**EFFECT OF ESTRUS EXPRESSION ON FOLLICULAR MORPHOLOGICAL
PARAMETERS IN BOVINE FEMALES INSEMINATED AT A FIXED TIME**

Raquel Gomes do AMARAL¹; Maria Antônia Moreira MACIEL¹; Artur Azevedo MENEZES²;
Marcus Vinícius Galvão LOIOLA²; Rodrigo Freitas BITTENCOURT²; Antonio de Lisboa
RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹

¹Centro Multidisciplinar do Campus da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra,
BA, Brasil.

²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador,
BA, Brasil.

*E-mail: raquel.a4378@ufob.edu.br.

Abstract

The present study aimed to evaluate the follicular parameters of Nelore females that expressed estrus or not in an FTAI program. Sixty-five lactating Nelore females were used, submitted to an FTAI protocol, which started on day zero (D0) using an intravaginal progesterone-releasing device associated with 2.0mg of Estradiol Benzoate IM. On day nine (D9) the intravaginal progesterone devices were removed and 500µg of cloprostenol sodium IM were applied; 0.6mg IM Estradiol Cypionate and 300IU Equine Chorionic Gonadotropin IM. At this time, the animals were marked with a marker stick in order to detect estrus expression. On D11 of the protocol, the animals were separated into two groups: animals with estrus expression (C/ESTRUS) and animals without estrus expression (S/ESTRUS). Also on D11, the ovaries were located and evaluated by ultrasound in B-mode and Doppler-mode to determine the diameter of the pre-ovulatory follicle (DFOL), the total area of the pre-ovulatory follicle wall (AFOL), the area of vascularization of the preovulatory follicle wall (VFOL) and the percentage of vascularization in the area of the preovulatory follicle wall (%VFOL). The animals of the group C/ESTRUS presented a DFOL, AFOL, VFOL higher ($P<0.05$) than the averages presented by the cows of the group S/ESTRUS. Regarding the %VFOL characteristic, there was no significant difference between the groups. In this way, the observation of estrus proved to be useful to direct matings of bovine females in synchronization protocols, being a tool that allows identifying animals with better conditions for the establishment of pregnancy, since females that express estrus have better follicular characteristics.

Keywords: *Bos taurus indicus*, artificial insemination, estrus, follicles.

Introdução

Apesar das inúmeras melhorias promovidas pela implementação de programas de IATF no manejo reprodutivo no sistema de criação de bovinos, as taxas de concepção encontram-se em aproximadamente 50%. Estudos apontam que o incremento da detecção de estro antes da



inseminação artificial propriamente dita nos protocolos de IATF, pode aumentar o sucesso desta técnica (FERRAZ *et al.*, 2017).

Neste contexto, Cooke *et al.* (2019) verificaram em estudo com vacas Nelore submetidas a IATF, que fêmeas que expressaram estro apresentaram grande dimensões do folículo pré-ovulatório e elevadas concentrações de estradiol no período periovulatório do protocolo de IATF.

Seguindo esta linha de pesquisa, alguns estudos avaliando a hemodinâmica folicular por ultrassonografia modo doppler colorido tem demonstrado que, folículos pré-ovulatórios com elevada vascularização, apresentaram maior suprimento de colesterol, resultando, em elevada produção de estrógeno durante a fase periovulatória (ACOSTA *et al.*, 2003; PUGLIESE *et al.*, 2017).

Diante disso, o presente estudo objetivou avaliar os parâmetros foliculares de fêmeas Nelore que expressaram estro ou não em um programa de IATF.

Materiais e Métodos

Local e Animais:

O experimento foi realizado durante os meses de agosto de 2020 até julho de 2021, no município de Barra, região oeste da Bahia. Foram utilizados dados de 65 fêmeas Nelore lactantes (*Bos taurus indicus*), múltipara, escore de condição corporal (ECC) de 3, avaliadas utilizando-se a escala de 1 a 5. Coletou-se informações apenas de vacas submetidas ao exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal sem registro de anormalidades reprodutivas e sem histórico de aborto. Todos os animais usados neste experimento receberam vacinação contra doenças da esfera reprodutiva e obedecem ao calendário oficial estadual de vacinação. Os animais foram manipulados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e o estudo aprovado pelo Comitê de Ética Local Animal da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), BA, Brasil, sob protocolo número 002/2018.

Protocolo de sincronização:

Utilizou-se as informações de animais que foram submetidos ao seguinte protocolo de sincronização: em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia 0 (D0) receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona associado a 2,0mg de Benzoato de Estradiol por via intramuscular (IM). No dia nove (D9) realizou-se a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona e foram aplicados 500µg de cloprostenol sódico IM; 0,6mg de cipionato de estradiol



IM e 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina IM. Neste momento, os animais foram marcados com bastão marcador (RAIDEX, Walmur, Porto Alegre, Brasil) entre a tuberosidade sacral e a inserção da cauda para determinação da expressão do estro. No dia 11 (D11) do protocolo de sincronização os animais foram caracterizados em dois grupos experimentais de acordo com a expressão do estro verificada pela remoção da tinta do bastão marcador: Grupo Sem expressão do estro (S/ ESTRO)- permanência da cor ou perda parcial da intensidade da tinta e Grupo com expressão do estro (C/ ESTRO)- remoção completa da cor e intensidade da tinta.

Avaliações Ultrassonográficas:

Parâmetros foliculares

As características foliculares foram monitoradas por avaliações ultrassonográficas modo B e Doppler colorido realizado no dia 11 do protocolo de sincronização, imediatamente antes de cada IATF. Os ovários foram localizados e avaliados por ultrassonografia em modo B e modo Doppler para determinação do diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL), da área total da parede do folículo pré-ovulatório (AFOL), da área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório (VFOL) e do percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório (%VFOL)

Processamento estatístico:

Os dados foram processados pelo *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 19) com nível de significância de 5%. As diferenças dos parâmetros foliculares (DFOL, AFOL, VFOL e %VFOL) entre os animais C/ ESTRO e S/ ESTRO foram comparadas por meio do teste t de Student.

Resultados e Discussão

Os parâmetros morfológicos foliculares demonstraram resultados superiores ($P < 0,05$) para as médias de DFOL, AFOL e VFOL no grupo COM ESTRO, quando comparado ao grupo SEM ESTRO. Contudo, as médias referentes à %VFOL esboçaram tendência ($P=0,09$) entre os grupos COM ESTRO e SEM ESTRO (Tabela 1.).

Tabela 1 - Média e desvio padrão (S) do diâmetro folicular (DFOL), da área da parede folicular (AFOL), da área de vascularização da parede folicular (VFOL) e do percentual de vascularização do folículo



(%VFOL) de acordo com a expressão do estro de fêmeas bovinas Nelore submetidas a um Programa para Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

Grupos experimentais	Nº de Animais	DFOL Média±S (cm)	AFOL Média±S (cm ²)	VFOL Média±S (cm ²)	%VFOL Média±S (%)
COM ESTRO	38	1,23 ± 0,18 ^a	0,43 ± 0,13 ^a	0,22 ± 0,11 ^a	49,13 ± 17,24
SEM ESTRO	27	0,98 ± 0,24 ^b	0,32 ± 0,09 ^b	0,13 ± 0,07 ^b	41,27 ± 16,77
TOTAL	65	1,12 ± 0,24	0,39 ± 0,13	0,18 ± 0,10	46,07 ± 17,35

^{a,b}Letras distintas dentro das colunas indicam diferença entre si pelo teste *t* de Student ($P < 0.05$).

Estes dados se assemelham aos encontrados em estudos anteriormente realizados por Ferraz *et al.* (2017) com vacas Nelore submetidas a um protocolo de IATF, em que analisaram o DFOL no momento da inseminação artificial (IA) e obtiveram médias de $12,61 \pm 3,34$ mm e $10,30 \pm 2,98$ mm cm para fêmeas com expressão de estro e sem expressão de estro, respectivamente. Pereira *et al.* (2016), em pesquisa com vacas leiteiras submetidas a protocolos de IATF e TETF, também observaram relação positiva entre a apresentação de características de estro e maior tamanho folicular, corroborando aos achados do presente estudo.

Além disto, Atkins *et al.* (2010) realizaram em estudo com vacas de corte e verificaram que folículos de menor diâmetro ou imaturos foram associados à excreção de reduzidas concentrações séricas de estradiol no período pré-ovulatório. Este fator está relacionado à menor aporte sanguíneo folicular, tornando-o incapaz de secretar quantidades suficientes de estradiol, sendo este o hormônio responsável pela regulação do ambiente uterino para recebimento de uma nova gestação, início da cascata de ovulação e apresentação de características de estro (PUGLIESI *et al.*, 2017).

No entanto, na literatura existe uma escassez de trabalhos que correlacionam a expressão de características de estro e a vascularização folicular, sendo este estudo, um dos pioneiros em indicar que fêmeas com maior irrigação sanguínea a nível folicular demonstram de forma acentuada características de estro. Sendo assim, a avaliação de características morfológicas foliculares em



associação a observação de cio em fêmeas bovinas podem ser utilizados como método de avaliação da funcionalidade folicular (ACOSTA *et al.*, 2003).

Desta forma, a expressão de características de estro, relacionou-se positivamente com os parâmetros morfológicos foliculares observados neste estudo, tornando esta ferramenta útil para direcionar acasalamentos de fêmeas bovinas em protocolos de sincronização, sendo uma ferramenta que permite identificar animais com melhores condições para o estabelecimento da gestação.

Conclusão

A observação de estro demonstrou-se útil para direcionar acasalamentos de fêmeas bovinas em protocolos de sincronização neste presente trabalho, sendo uma ferramenta que permite identificar animais com melhores condições para o estabelecimento da gestação, uma vez que as fêmeas que expressam estro apresentam melhores características foliculares.

Referências

ACOSTA, T. J.; HAYASHI, K. G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. 2003. **Reproduction**. V.125, p.759-767.

ATIKINS, J. A.; SMITH, M. F.; WELLS, K. J.; GEARY, T. W. Factors affecting preovulatory follicle diameter and ovulation rate after gonadotropin-releasing hormone in postpartum beef cows. Part I: Cycling cows. 2010. **Journal of Animal Science**, V. 88, p.2300-2310.

COOKE, R. F.; POHLER, K. G.; VASCONCELOS, J. L. M.; CERRI, R. L. A. Estrous expression during a fixed-time artificial insemination protocol enhances development and interferon-tau messenger RNA expression in conceptuses from *Bos indicus* beef cows. 2019. **Animal**. p.1-7.

FERRAZ, P. A.; LAIOLA, M. V. G.; RODRIGUES, A. S.; LIMA, M. C. C.; BITTENCOURT, T. C. B. D. C. de; RIBEIRO FILHO, A. L. Efeito da intensidade da expressão do estro no diâmetro folicular e na fertilidade de vacas nelore submetidas a um programa de IATF. 2017. **Ciência animal brasileira**, Goiania-GO. V.18, p.1-9.

PEREIRA, M. H. C.; WILTBANCK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. 2016. **Journal of Dairy Science**, V. 99, p.1-11.

PUGLIESI, G.; REZENDE, R. G.; SILVA, J. C. B. da; LOPES, E.; NISHIMURA, T. K.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BINELLI, M. Uso da ultrassonografia Doppler em programas de IATF e TETF em bovinos. 2017. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte-MG. V. 41, n.1, p.140-150.



EFEITO DA INIBIÇÃO POR CONTATO SOBRE A SINCRONIZAÇÃO EM G_0/G_1 DE FIBROBLASTOS DERIVADOS DE ONÇAS-PARDAS

EFFECT OF CONTACT INHIBITION ON G_0/G_1 SYNCHRONIZATION OF PUMA- DERIVED FIBROBLASTS

Luanna Lorena Vieira RODRIGUES^{1*}; Yasmin Beatriz França MOURA¹, João Vitor da Silva VIANA¹; Lhara Ricarlany Medeiros de OLIVEIRA¹; Herlon Victor Rodrigues SILVA²; José de Brito VIEIRA NETO³; Claudia PESSOA³; Alessandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

³Laboratório de Oncologia Experimental, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

*luannavieira59@gmail.com

Resumo

A clonagem por transferência nuclear consiste em uma alternativa para a conservação de onças-pardas. Nesse contexto, a otimização das etapas envolvidas nessa biotécnica, como a sincronização dos fibroblastos (carioplastos) em G_0/G_1 , são cruciais para o seu sucesso na espécie. Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito da inibição por contato sobre a sincronização em G_0/G_1 de fibroblastos derivados de onças-pardas. Para tanto, foram utilizados fibroblastos criopreservados da terceira passagem obtidos de fragmentos de pele de três fêmeas adultas. Após a descongelamento, fibroblastos cultivados e com 90–100% de confluência foram avaliados por 24 h e 48 h quanto à viabilidade e sincronização em G_0/G_1 . Fibroblastos em 70% de confluência foram empregados como o grupo controle. Para análise do ciclo celular, células ao final de cada período foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas em etanol e armazenadas a -4°C . Posteriormente, células foram incubadas em solução composta por iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e RNase (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 50 min. Subsequentemente, todas as células foram analisadas por citômetro de fluxo. Para cada amostra, 15.000 eventos foram registrados, e histogramas gerados para avaliar o percentual de células em cada fase do ciclo celular (G_0/G_1 , S, G_2/M) usando o software MODFIT. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados pelo software GraphPad. Assim, fibroblastos submetidos à inibição por contato por 24 h ($84,0\% \pm 1,8$) e 48 h ($84,6\% \pm 0,6$) apresentaram um maior percentual de G_0/G_1 , quando comparados aos fibroblastos não submetidos à sincronização ($73,9\% \pm 3,0$, $P < 0,05$). Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os fibroblastos não sincronizados ($10,4\% \pm 2,3$) e sincronizados por 24 h ($7,8\% \pm 2,3$) e 48 h ($3,9\% \pm 1,2$) para a fase S. Adicionalmente, um menor percentual em G_2/M foi observado para o grupo sincronizado com 24 h, quando comparado aos demais grupos. Portanto, inibição por contato por 24 h ou 48 h promoveu a sincronização de fibroblastos de onças-pardas em G_0/G_1 . Estes resultados são relevantes para o desenvolvimento da técnica de clonagem em onça-parda.

Palavras-chave: felídeos silvestres, reprodução assistida, clonagem, carioplastos.

Abstract

Cloning by nuclear transfer is an alternative for the conservation of pumas. In this context, the optimization of the steps involved in this biotechnology, such as the synchronization of fibroblasts



(karyoplasts) in G₀/G₁, are crucial for its success in the species. Therefore, the objective was to evaluate the effect of contact inhibition on G₀/G₁ synchronization of fibroblasts derived from puma. For this purpose, cryopreserved third passage fibroblasts obtained from skin fragments of three adult females were used. After thawing, cultured fibroblasts with 90–100% confluence were evaluated for 24 h and 48 h for viability and synchronization in G₀/G₁. Fibroblasts at 70% confluence were used as the control group. For cell cycle analysis, cells at the end of each period were trypsinized, centrifuged, fixed in ethanol and stored at -4°C. Subsequently, cells were incubated in a solution composed of propidium iodide (20 µg/ml) and RNase (50 µg/ml) for 50 min. Subsequently, all cells were analyzed by flow cytometer. For each sample, 15,000 events were recorded, and histograms generated to assess the percentage of cells in each cell cycle phase (G₀/G₁, S, G₂/M) using MODFIT software. Data were expressed as mean ± standard error and analyzed using the GraphPad software. Thus, fibroblasts submitted to contact inhibition for 24 h (84.0% ± 1.8) and 48 h (84.6% ± 0.6) showed a higher percentage of G₀/G₁ when compared to fibroblasts not submitted to synchronization (73.9% ± 3.0, P < 0.05). Furthermore, no difference was observed between non synchronized (10.4% ± 2.3) and synchronized fibroblasts for 24 h (7.8% ± 2.3) and 48 h (3.9% ± 1.2) for the S phase. Additionally, a lower percentage in G₂/M was observed for the group synchronized with 24 h, when compared to the other groups. Therefore, contact inhibition for 24 h or 48 h promoted the synchronization of puma fibroblasts in G₀/G₁. These results are relevant for the development of the puma cloning technique.

Keywords: Wild felids, assisted reproduction, cloning, karyoplasts.

Introdução

A onça-parda possui ampla distribuição geográfica no continente americano, habitando desde áreas desérticas até regiões montanhosas (GUERISOLI *et al.*, 2019). Nestes habitats, essa espécie apresenta importantes papéis ecológicos, como a função de superpredador, atuando no controle populacional de mesopredadores (NÁJERA *et al.*, 2018; GUERISOLI *et al.*, 2019). De acordo com a União Internacional para a Conservação da Natureza (NIELSEN *et al.*, 2015), a espécie é classificada como pouco preocupante quanto ao risco de extinção. Contudo, os referidos autores descreveram que a onça-parda já se encontra extinta em parte dos Estados Unidos e algumas áreas da América do Sul, principalmente no bioma Caatinga.

Neste cenário, estratégias de conservação têm sido propostas, tais como o uso da clonagem por transferência nuclear de células somáticas. Nesta técnica, o desenvolvimento da etapa de sincronização dos fibroblastos (carioplastos) em G₀/G₁ é crucial para o sucesso da clonagem na espécie (VERAGUAS *et al.*, 2017). Entre os métodos de sincronização do ciclo celular já empregados têm-se a inibição por contato, que embora apresente resultados promissores em diferentes espécies, sua resposta ainda é espécie-específica e depende do tempo de avaliação, sendo necessária sua avaliação em fibroblastos de onças-pardas.



Portanto, o objetivo foi avaliar o efeito da inibição por contato sobre a sincronização em G_0/G_1 de fibroblastos derivados de onças-pardas.

Material e métodos

Fibroblastos criopreservados da terceira passagem obtidos de fragmentos de pele de três fêmeas adultas foram empregados no presente trabalho. Após a descongelação, fibroblastos cultivados e com 90–100% de confluência foram avaliados por 24 h e 48 h quanto à viabilidade e sincronização em G_0/G_1 . Fibroblastos em 70% de confluência foram empregados como o grupo controle.

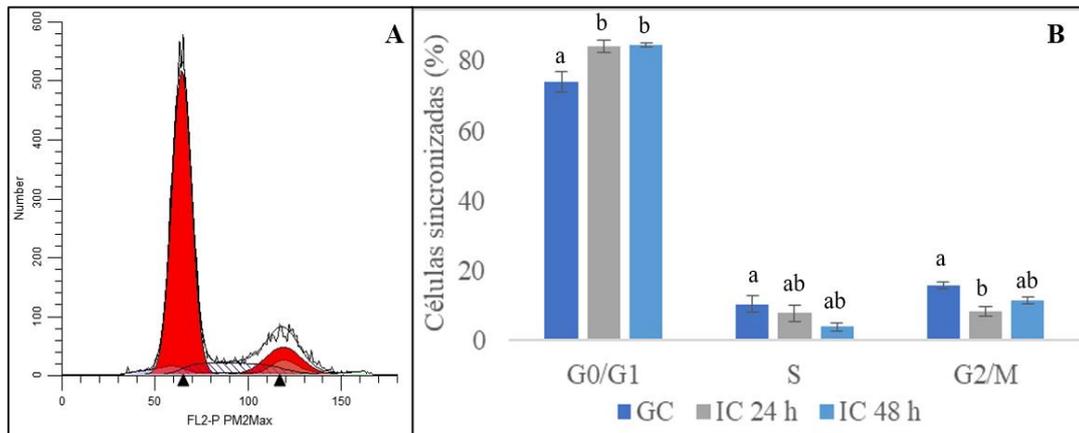
Para análise do ciclo celular, células ao final de cada período foram tripsinizadas, centrifugadas, fixadas em etanol e armazenadas a -4°C . Posteriormente, células foram incubadas em solução composta por iodeto de propídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e RNase (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 50 min. Subsequentemente, todas as células foram analisadas por citômetro de fluxo (Guava Technologies, Stamford, Lincolnshire, United Kingdom). Para cada amostra, 15.000 eventos foram registrados, e histogramas de fluorescência vermelha vs. contagens foram gerados para avaliar os percentuais de células para cada fase do ciclo celular (G_0/G_1 , S, G_2/M). A proporção de células em cada fase do ciclo celular foi avaliada usando o software MODFIT versão 5.0.

Finalmente, os dados foram expressos como média \pm erro padrão e analisados pelo software Graphpad Instat 3.06 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Todos os resultados foram verificados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo teste de Levene. Como os dados não apresentaram distribuição normal, eles foram transformados em arco-seno e analisados por ANOVA seguido de teste de Tukey, a $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Após a análise em citometria de fluxo (Fig. 1A), os fibroblastos submetidos à inibição por contato por 24 h ($84,0\% \pm 1,8$) e 48 h ($84,6\% \pm 0,6$) apresentaram um maior percentual de G_0/G_1 , quando comparados aos fibroblastos não submetidos à sincronização ($73,9\% \pm 3,0$, Fig. 1).

Figura 1 - Efeito da inibição por contato sobre a sincronização do ciclo de fibroblastos de onças-pardas. **(A)** Histogramas representativo de células submetidas à sincronização. **(B)** Percentuais de G_0/G_1 , S e G_2/M em fibroblastos de onças-pardas submetidos à sincronização por inibição por contato. ^{ab} letras indicam diferenças entre os grupos na mesma fase ($P < 0,05$).



Além disso, nenhuma diferença foi observada entre os fibroblastos não sincronizados ($10,4\% \pm 2,3$) e sincronizados por 24 h ($7,8\% \pm 2,3$) e 48 h ($3,9\% \pm 1,2$) para a fase S. Adicionalmente, um menor percentual em G₂/M foi observado para o grupo sincronizado com 24 h ($8,3\% \pm 1,1$), quando comparado ao grupo controle ($15,7\% \pm 1,2$) e sincronizado por 48 h ($11,5\% \pm 1,2$, $P < 0,05$).

Esses resultados corroboram com aqueles observados em outros felídeos silvestres, tais como leopardo, tigre e leão (YELISETTI *et al.*, 2016) e em gato doméstico (VERAGUAS *et al.*, 2017). Em geral a eficiência da inibição por contato ocorre em virtude da privação das condições ideais de nutrição e ambiente, permitindo a célula permanecer em G₀/G₁ do ciclo (KUES *et al.*, 2000).

Conclusão

Esses resultados indicam que a inibição por contato por 24 h ou 48 h promoveu a sincronização de fibroblastos de onças-pardas em G₀/G₁. Tais informações são relevantes para o desenvolvimento da técnica de clonagem em onça-parda.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ecopoint Parque Ecológico e ao Zoológico Municipal Sargento Prata (Fortaleza, Ceará) pelo acesso e manejo das onças-pardas, ao Comitê de Ética de Uso de Animais, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido e ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento



de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

GUERISOLI, M.L.M. CARUSO, N.; VIDAL, E.M.L.; LUCHERINI, M. Habitat use and activity patterns of *Puma concolor* in a human-dominated landscape of central Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 100, p. 202-211, 2019.

NÁJERA, D.M.A.; PALOMARES, F.; CHÁVEZ, C.; TIGAR, B.; MENDOZA, G.D. Jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) diets in Quintana Roo, Mexico. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 41, p. 257-266, 2018.

NIELSEN, C.; THOMPSON, D., KELLY, M.; LOPEZ-GONZALEZ, C.A. 2015. *Puma concolor*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T18868A97216466.

VERAGUAS, D.; AGUILERA, C.; ECHEVERRY, D.; SAEZ-RUIZ, D.; CASTRO, F.O.; ALVAREZ, L.R. Embryo aggregation allows the production of kodkod (*Leopardus guigna*) blastocysts after interspecific SCNT. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 881-889, 2017.

YELISETTI, U.M.; KOMJETI, S.; KATARI, V.C.; SISINTHY, S.; BRAHMASANI, S.R. Interspecies nuclear transfer using fibroblasts from leopard, tiger, and lion earpiece collected postmortem as donor cells and rabbit oocytes as recipients. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 52, p. 632-645, 2016.



EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO À PROGESTERONA SOBRE OS PARÂMETROS FOLICULARES DE FÊMEAS ACÍCLICAS E LACTANTES SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE IATF

EFFECT OF PRE-EXPOSURE TO PROGESTERONE ON FOLLICULAR PARAMETERS OF ACYCLIC AND LACTATING FEMALES UNDERGOING AN FTAI PROGRAM

Maria Antônia Moreira MACIEL^{1*}; Raquel Gomes do AMARAL¹; Wendel Denian Silva dos SANTOS¹; Daniel Bispo FERREIRA¹; Horácio Matheus Gomes ALENCAR²; Alexandra Soares RODRIGUES¹.

¹Centro Multidisciplinar do *Campus* da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil.

²Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil.

*E-mail: maria.m8290@ufob.edu.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da pré-sincronização com P4 injetável sobre os parâmetros morfofuncionais foliculares de fêmeas Nelore lactantes submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 34 fêmeas bovinas lactantes (*Bos taurus indicus*), pertencentes à categoria plurípara, com idade de 5 a 7 anos, escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 2,75. A pré-sincronização ocorreu através um dia aleatório do ciclo estral, neste momento, os animais foram divididos em dois tratamentos: Grupo P4i (n=50) - administrou-se 150mg de progesterona injetável de longa ação por via intramuscular (IM) e Grupo controle (n=50) - realizou-se a aplicação 1mL de solução fisiológica IM. Dez dias após a pré-sincronização, ocorreu o protocolo de sincronização para IATF. As fêmeas do Grupo Controle (n=16) demonstraram médias de diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL), área do folículo pré-ovulatório (AFOL), vascularização do folículo pré-ovulatório (VFOL) e percentual de vascularização do folículo pré-ovulatório (%VFOL) de $1,08 \pm 0,20$ cm, $0,26 \pm 0,08$ cm², $0,09 \pm 0,04$ cm² e $40,20 \pm 19,65$ % respectivamente, enquanto que o Grupo P4i (n=18) apresentaram valores equivalentes de $1,06 \pm 0,20$ cm, $0,23 \pm 0,09$ cm², $0,09 \pm 0,04$ cm² e $44,54 \pm 21,87$ %. Deste modo, concluiu-se que a exposição prévia à progesterona não afetou os parâmetros morfofuncionais foliculares em fêmeas Nelore submetidas a um protocolo de sincronização.

Palavras-chaves: Ciclo estral, Diâmetro folicular, P4 injetável, Sincronização.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effect of pre-synchronization with injectable P4 on the follicular morphofunctional parameters of lactating Nelore females submitted to a fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol. Thirty-four lactating bovine females (*Bos taurus indicus*), belonging to the pluriparous category, aged 5 to 7 years, body condition score (BCS) between 2.5 and 2.75 were used. The pre-synchronization occurred through a random day of the estrous cycle, at this moment, the animals were divided into two treatments: Group P4i (n=50) - 150mg of long-acting injectable progesterone was administered intramuscularly (IM) and Group control (n=50) - 1mL of saline solution IM was applied. Ten days after the pre-synchronization, the synchronization protocol for FTAI took place. The females in the Control Group (n=16)



showed means of pre-ovulatory follicle diameter (DFOL), pre-ovulatory follicle area (AFOL), pre-ovulatory follicle vascularization (VFOL) and percentage of pre-ovulatory follicle vascularization. (%VFOL) of 1.08 ± 0.20 cm, 0.26 ± 0.08 cm², 0.09 ± 0.04 cm² and 40.20 ± 19.65 % respectively, while the P4i Group (n=18) showed equivalent values of 1.06 ± 0.20 cm, 0.23 ± 0.09 cm², 0.09 ± 0.04 cm² and 44.54 ± 21.87 %. Thus, it was concluded that previous exposure to progesterone did not affect follicular morphofunctional parameters in Nelore females submitted to a synchronization protocol.

Keywords: Estrous cycle, Follicular diameter, injectable P4, Synchronization.

Introdução

Na pecuária de corte, a produtividade está relacionada diretamente com a eficiência reprodutiva do rebanho, e os principais gargalos que dificultam o aumento na produção do rebanho bovino brasileiro estão relacionados à puberdade tardia, longos períodos de anestro pós-parto e um grande intervalo entre partos (LIMA, 2017).

De acordo com Claypool *et al.*, (2019), o baixo ECC e o período de lactação, aliado a baixa disponibilidade de alimento, acarretam na incapacidade das vacas de atenderem suas demandas energéticas, propiciando, portanto, um período de balanço energético negativo (BEN), uma série de alterações metabólicas e endócrinas, que por sua vez, afetam o desenvolvimento folicular e as taxas de fertilização.

Neste contexto, para superar as particularidades fisiológicas do rebanho brasileiro é indispensável o desenvolvimento de ferramentas que associadas ao protocolo convencional de IATF, promovam a otimização dos índices reprodutivos (SÁ FILHO *et al.*, 2010). Desse modo, algumas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de aperfeiçoar os programas de reprodução assistida em fêmeas lactantes e acíclicas, podendo destacar a pré-sincronização com a utilização de progesterona (P4) injetável no protocolo de IATF (SALES *et al.*, 2019).

Sales *et al.* (2019), realizaram experimentos testando a estimulação prévia com P4 exógena em protocolos de sincronização em bovinos e obtiveram resultados positivos, atribuindo tais achados, ao efeito da pré-sincronização em proporcionar uma recuperação dos estoques de LH e adequada pulsatilidade no período pós-parto, favorecendo a ovulação. Adicionalmente aos achados supracitados, Pereira *et al.* (2019) indicaram que o uso da P4 injetável, anteriormente à sincronização, proporcionou o desenvolvimento de maiores folículos no momento da retirada do dispositivo de progesterona e da IATF, podendo influenciar na eficiência reprodutiva.



Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da pré-exposição à P4 injetável sobre os parâmetros morfofuncionais foliculares de fêmeas Nelore em anestro e lactantes submetidas a um programa para IATF.

Material e métodos

Local e animais:

O experimento foi realizado na Fazenda Belo Horizonte, localizada no município de Barra, região Oeste da Bahia, o mesmo iniciou em agosto de 2021 e teve conclusão em julho de 2022. A propriedade adota um sistema extensivo de criação de animais em pastagem com a utilização do capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*), suplementação mineral e água ad libitum.

Foram utilizadas 34 fêmeas da raça Nelore lactantes com em média 50 a 60 dias de pós-parto, pertencentes à categoria plurípara, idade de 5 a 7 anos, escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 a 2,75, avaliado utilizando-se a escala de 1 a 5. Os animais foram submetidos a um exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, sendo aptas a participarem dos experimentos, fêmeas que apresentaram ausência de anormalidades no trato reprodutivo e ausência de corpo lúteo.

As fêmeas foram manipuladas em conformidade com a Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), BA, Brasil, sob número de protocolo 0034/2022.

Protocolos de sincronização:

As fêmeas foram submetidas a um protocolo sincronização que se iniciou em um dia aleatório denominado como dia -10 (D-10), neste momento os animais foram divididos aleatoriamente em dois tratamentos: Grupo P4i (n=18) – administrou-se 150mg de progesterona injetável de longa ação por via intramuscular (im) e Grupo controle (n=16) – realizou-se a aplicação 1mL de solução fisiológica im. No dia zero (D0), foi feita a inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1,0g de progesterona, associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (im). No dia oito (D8) foi realizada a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona, os animais receberam, 500µg de cloprostenol sódico im, 300UI de gonadotrofina coriônica equina e aplicou-se 1mg de cipionato de estradiol im.

Avaliações Ultrassonográficas:



No D10 do protocolo de sincronização, os exames ultrassonográficos foram executados utilizando um aparelho portátil equipado com as funções modo B e doppler colorido (Sonoscape S2VET).

Parâmetros foliculares

As características foliculares foram monitoradas por avaliações ultrassonográficas modo B e Doppler colorido, imediatamente antes de cada IA. A imagem do maior folículo foi congelada para determinação do diâmetro do folículo pré-ovulatório (DFOL) e da área total da parede do folículo pré-ovulatório (AFOL). As imagens dos folículos foram armazenadas também com recurso Doppler colorido ativado para quantificar a área de vascularização da parede do folículo pré-ovulatório (VFOL).

Posteriormente, foi feito o cálculo da área de vascularização utilizando o cursor para determinar a área de vascularização na parede do folículo. O percentual de vascularização na área da parede do folículo pré-ovulatório (%VFOL) foi obtido pela razão entre a área de vascularização e área total da parede folicular.

Procedimentos estatísticos:

Os dados foram processados usando o *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 19) foi considerado um nível de significância de 5%. Para tanto, realizou-se a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio-padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As diferenças para as médias de DFOL, AFOL, VFOL e %VFOL entre os grupos P4i e controle foram avaliadas utilizando-se teste t de Student.

Resultados e discussão

No presente trabalho, o Grupo Controle demonstrou médias de DFOL, AFOL, VFOL e %VFOL de $1,08 \pm 0,20\text{cm}$, $0,26 \pm 0,08\text{cm}^2$, $0,09 \pm 0,04\text{cm}^2$ e $40,20 \pm 19,65\%$ respectivamente, enquanto que o Grupo P4i apresentou valores equivalentes de $1,06 \pm 0,20\text{cm}$, $0,23 \pm 0,09\text{cm}^2$, $0,09 \pm 0,04\text{cm}^2$ e $44,54 \pm 21,87\%$, não sendo observada diferença significativa entre os grupos, conforme esboçado na Tabela 1.

Tabela 1 - Média, desvio padrão (S) e intervalo de confiança (IC) do diâmetro folicular (DFOL), da área folicular (AFOL), da área de vascularização do folículo (VFOL) e do percentual de vascularização do folículo (%VFOL) de fêmeas bovinas Nelore acíclicas e lactantes submetidas ou não à pré-sincronização com progesterona injetável em um protocolo para IATF.



<u>Variáveis</u>	<u>Controle</u>	<u>P4</u>	<u>IC</u>
DFOL Média±S (cm)	1,08±0,20 ^b	1,06±0,21 ^a	-0,13–0,15
AFOL Média±S (cm ²)	0,26±0,08 ^b	0,23±0,09 ^a	-0,03–0,09
VFOL Média±S (cm ²)	0,09±0,04 ^b	0,09±0,04 ^a	-0,02–0,03
%VFOL Média±S (%)	40,20±19,65 ^b	44,54±21,87 ^a	-18,89–10,22

^{ab}Letras distintas dentro das colunas indicam diferença entre si pelo teste t de Student (P < 0.05).

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Simões *et al.* (2018), em que, avaliando os efeitos da pré-exposição à progesterona injetável sobre o diâmetro folicular em vacas *Bos indicus* em um protocolo de sincronização, não encontraram diferenças significativas entre as dimensões foliculares dos grupos testados no momento da IA, em que o Grupo Controle obteve $1,26 \pm 0,3$ cm de diâmetro e o Grupo P4i $1,30 \pm 0,3$ cm. Do mesmo modo, Silva *et al.* (2018) em experimento realizado a partir do efeito da pré-sincronização em protocolos Double Ovsynch e P4synch, em vacas leiteiras mestiças, verificaram que as características foliculares foram semelhantes. As fêmeas do grupo Double Ovsynch obtiveram dados de DFOL de $1,76 \pm 0,5$ cm, enquanto que os resultados do grupo P4synch foram de $1,79 \pm 0,4$ cm.

Contudo, os parâmetros foliculares não diferiram entre si neste experimento, o que pode ser justificado por Sá Filho *et al.* (2010) que ao trabalharem com vacas em anestro pós-parto com o uso do pré-tratamento com dispositivo de P4 intravaginal, sugeriram uma relação positiva no desenvolvimento das células epiteliais do lúmen e das glândulas endometriais com o tratamento hormonal, sendo, portanto, associado a um ambiente uterino favorável e propício para receber o embrião, sem afetar o crescimento folicular.

Conclusão

Sendo assim, conclui-se que a administração de progesterona injetável dez dias antes do início do protocolo de sincronização não afetou as características morfofuncionais do folículo de vacas Nelore lactantes e acíclicas.



Referências

CLAYPOOL, C. K.; SPENSER, J. A.; MEGEGATTI ZOCCA, S.; SHAFII, B.; PRICE, W. J.; AHMADZADEH, A.; RIMBEY, N. R.; DALTON, J. C. Short communication: Reproduction outcomes in dairy heifers following a 14-d progesterone insert presynchronization protocol. **J Dairy Sci**, v. 102, n. 12, p. 11730-11735, 2019.

LIMA, R. S. **Emprego de progesterona injetável de longa ação para pré-sincronização da ovulação em novilhas Nelore**. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Pirassununga, p. 87, 2017.

PEREIRA, M. H. C.; WILTBANK, M. C.; GUIDA, T. G.; LOPES JR, F. R.; CAPPELLOZZA, B. I.; VASCONCELOS, J. L. M. Evaluation of presynchronization and addition of GnRH at the beginning of an estradiol/progesterone protocol on circulating progesterone and fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 147, p. 124-134, 2019.

SÁ FILHO, O.G. **Efeito do tratamento com progesterona e do diâmetro folicular nas características histológicas e moleculares uterinas em vacas Nelore em anestro pós-parto**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, p. 183, 2010.

SALES, J. N. S.; SIMÕES, L. M. S.; ORLANDI, R. E.; LIMA, E. A.; SANTOS, A. P. C.; BOTTINO, M. P.; SILVA, L. A. C. L.; SOUZA, J. C.; DIAS, M. M.; MASSONETO, J. P. M.; SCANDIUZZI JR, L. A.; FREITAS, B. G.; GUERREIRO, B. M.; BASTOS, M. R. Pre-TAI protocol strategies to increase reproductive efficiency in beef and dairy cows. **Anim Reprod**, v.16, n.3, p. 402-410, 2019.

SILVA, L. A. C. L.; SIMÕES, L. M. S.; BOTTINO, M. P.; SANTOS, A. P. C.; SANTOS, G.; MARTINEZ, I. Y. H.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI P. S.; SALES, J. N. S. Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation synchronization protocol in crossbred dairy cows. **Theriogenology**, v. 119, p. 233-237, 2018.

SIMÕES, L. M. S.; ORLANDI, R. E.; MASSONETO, J. P. M.; SCANDIUZZI JR, L. A.; FREITAS, B. G.; BASTOS, M. R.; SOUZA, J. C.; SALES, J. N. S. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28-33, 2018.



EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES NOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS CRIOPRESERVADOS PELA RECUPERAÇÃO EPIDIDIMÁRIA POR FLUXO RETRÓGRADO

EFFECT OF DIFFERENT DILUTERS ON SPERMATOZOA CATTLE CRYOPRESERVED BY EPIDYMAL RECOVERY BY RETROGRADE FLOW

Sérgio Henrique COSTA JÚNIOR^{1*}; Leonardo Lopes FURTADO³; Gabriel Aquino ROCHA⁴;
Muriel Alves CARVALHO²; Wallisson Bruno de Moraes PACHECO²; Maria Luíza Lima
CORDEIRO²; José Adalmir Torres de SOUZA⁵

¹Especialista em Reprodução Animal – UFPI/CCA, Teresina – PI, BR.

²Mestre em Ciência Animal – UFPI/CCA, Teresina – PI, BR.

³Médico Veterinário – UFPI/CCA, Teresina – PI, BR.

⁴Graduando em Medicina Veterinária – UFPI/CCA, Teresina – PI, BR.

⁵Professor Titular – UFPI/DCCV/CCA, Teresina – PI, BR.

*E-mail: sergiocosta94@outlook.com

Abstract

Techniques for collecting epididymal sperm are used in several animal species, being important biotechnology tools applied in cases of animals that need to be castrated or that have died in several species. Five scrotal sacs were collected from post-mortem bovines, the epididymis were divided into two groups, as follows: right (n=5) and left (n=5) epididymis submitted to retrograde flow by the Andromed® and TRIS-Gema extenders, respectively. After recovery, immediate and mediate tests were performed to qualify the samples to be submitted to the cryopreservation process, packaged in a 0,25mL straw at a concentration of 25x10⁶ viable spermatozoa and frozen in a TK 3000® machine. Subsequently, the samples were thawed and evaluated for sperm kinetics, cell viability, plasma membrane integrity and mitochondrial potential. The use of TRIS-Gema and Andromed® extenders can be used for post-mortem sperm recovery, however, post-cryopreservation kinetics were reduced, but preserving mitochondrial and plasma sperm viability.

Keywords: Biotechnology; cryopreservation; epididymis

Introdução

Quando recuperados pouco tempo após a morte, os espermatozoides da cauda do epidídimo demonstram a mesma qualidade do sêmen colhido em vagina artificial (ÁLVAREZ *et al.*, 2012) e melhor qualidade quando comparado ao sêmen colhido por eletroejaculação (GARCÍA-ÁLVAREZ *et al.*, 2009), aplicadas em casos para assegurar a preservação do material genético, esses gametas, assim que recuperados e diluídos, são capazes de resistir à refrigeração e à criopreservação (EVANGELISTA *et al.*, 2020).

Para MARTINEZ-PASTOR *et al.* (2006), a colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas



apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos de recuperação.

A criopreservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de animais pode provocar mais danos nas células espermáticas que na congelação de espermatozoides colhidos pelas técnicas convencionais, principalmente com relação à resistência espermática ao choque térmico e ao estresse osmótico (ÁLVAREZ *et al.*, 2012), um dos principais pontos críticos é a qualidade espermática após o procedimento de criopreservação e descongelamento.

Análises associadas às sondas fluorescentes favorecem o conhecimento estrutural para o estudo da reprodução animal por possuir capacidade de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005) estimam com boa precisão o real potencial espermático nos reprodutores. Dessa forma, o objetivo do estudo baseia-se no uso de diluidores para a criopreservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo para análise da cinética e ultraestrutura espermática pós-criopreservação.

Material e métodos

Os procedimentos e métodos descritos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética e Uso de Animais – CEEA da Universidade Federal do Piauí sob nº 704/21.

Coleta e Grupos experimentais:

Foram coletados cinco sacos escrotais de bovinos *post-mortem* abatidos no matadouro “Abatedouro Municipal Santa Rita” (Teresina – PI), os complexos testículos-epidídimo receberam uma ligadura com fio de náilon no funículo espermático, sendo acondicionados em sacos plásticos estéreis contendo solução salina (NaCl 0,9%), sendo transportados em caixas isotérmicas a 37°C por um tempo máximo de uma hora e meia até a recuperação espermática.

Do quantitativo de sacos escrotais, os epidídimos foram divididos em dois grupos, sendo: epidídimo direito (n=5) e esquerdo (n=5) submetidos ao fluxo retrogrado pelo diluidores Andromed® e TRIS-Gema, respectivamente.



Avaliação imediata e criopreservação dos espermatozoides epididimários:

Para a técnica de fluxo retrógrado, após a dissecação do epidídimo nos testículos, foi introduzido um cateter periférico no ducto deferente até que o conteúdo seminal da cauda do epidídimo percorresse por meio de um corte realizado na junção com o corpo do epidídimo.

O conteúdo foi recuperado e diluído em 3mL do Andromed® e 3mL do diluidor Tris-Gema (20% de gema de ovo e 7% glicerol, com pH 7,0 e osmolaridade 316 mOsm/mL), para os epidídimos direito e esquerdo, respectivamente, permanecendo aquecido a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, sob aumento de 400x, foram analisadas a motilidade e o vigor espermático, avaliado em escala de 0 a 5, de acordo com a metodologia do CBRA (2013).

Para avaliação da concentração espermática (diluição de 1:200 em formol salino) foi realizada através da técnica Câmara de Neubauer e o resultado expresso em número de espermatozoides por mL. A análise da morfologia dos espermatozoides foi realizada por meio da técnica de câmara úmida e os defeitos classificados em maiores e menores de acordo com CBRA (2013) através microscopia com contraste de fase sendo 100 células contabilizadas.

Os espermatozoides, após a diluição e correção para a dose inseminante (25×10^6 espermatozoides viáveis por palheta de 0,25mL) foram criopreservados em máquina TK 3000® na curva de congelação positiva $0,25^\circ \text{C}/\text{min}$, de temperatura ambiente a 5°C e na curva de congelação negativa $-20^\circ \text{C}/\text{min}$, de 5°C a -120°C e, após atingir -120°C , as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijão com nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras congeladas foram depositadas em banho-maria a 37°C por 30 segundos para avaliação da cinética espermática pós-criopreservação e submetidas às análises de viabilidade celular, integridade da membrana plasmática e potencial mitocondrial.

Análise estatística:

Para a análise estatística dos dados foram obtidas médias e desvio-padrão das amostras de recuperação de espermatozoides epididimários, utilizando o Software SAS para Windows versão 9.0.

Resultados e discussão

A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento e o vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozoides, e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (CBRA, 2013). Os



espermatozoides recuperados diluídos com Andromed® e TRIS-Gema antes da criopreservação não apresentaram diferença estatística entre si na análise da cinética espermática (Tabela 1).

Um dos primeiros diluidores disponíveis, compostos por substâncias de produtos não originados de animais, é o Andromed®, apresentando como composição o extrato de soja. A gema de ovo é um dos principais crioprotetores não penetrantes, e seu principal benefício é fornecer uma fração LDL que previne a perda de fosfolípidios da membrana celular, proporcionando tolerância ao choque térmico e ao processo de criopreservação (AMIRAT *et al.*, 2004).

Tabela 1 - Motilidade e Vigor pré e pós-criopreservação de espermatozoides epididimários recuperados pela técnica de fluxo retrógrado com os diluidores Andromed® e TRIS-Gema.

Grupos Experimentais	Pré-congelação		Pós-congelação	
	M	V	M	V
Andromed	62,0±14,70	2,60±0,80	30,0±21,60	1,80±0,75
TRIS-Gema	68,0±10,30	2,80±0,40	36,0±10,68	1,60±0,49

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. M: motilidade; V: vigor.

Quanto às membranas espermáticas, pesquisas constataram que a membrana plasmática e a membrana acrossomal são de grande importância para inúmeros processos, incluindo os de capacitação espermática e reação acrossomal, fundamentais para fertilização (CAMPANHOLI *et al.*, 2017).

As amostras espermáticas criopreservadas com Tris-Gema foram estatisticamente superiores ao grupo Andromed® no percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Na avaliação do potencial da mitocôndria espermática, os grupos experimentais não diferiram entre si, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Análise da Integridade de membrana plasmática (MP) e potencial mitocondrial (MIT) dos espermatozoides epididimários (n=100) recuperados pela técnica de fluxo retrógrado com os diluidores Andromed® e TRIS-Gema pós-descongelação.

Grupos Experimentais	Sondas Espermáticas	
	MP (%)	MIT (%)
Andromed	55,4±19,81 ^b	55,8±5,04
TRIS-Gema	69,0±5,90 ^a	53,4±5,61

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. MP: Membrana plasmática; MIT: Membrana mitocondrial.



No que se refere à avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, e do potencial mitocondrial, a análise simultânea destes aumenta a acurácia da análise seminal, pois fornece um maior número de dados das células espermáticas, considerando que para manter a capacidade de fertilização são necessários espermatozoides com estrutura íntegra.

Lopes *et al.* (2020) avaliaram duas técnicas de recuperação, fluxo retrógrado e flutuação, de epidídimos de cães em relação à membrana plasmática não obtendo diferença significativa entre os grupos, o que foi observado no estudo que os tipos de diluidores também não influenciaram na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides.

Conclusão

O uso dos diluidores TRIS-Gema e Andromed® podem ser utilizados para recuperação espermática *post-mortem*, no entanto, a cinética pós-criopreservação com o meio Andromed mostrou-se reduzida, mas preservando viabilidade mitocondrial e plasmática dos espermatozoides.

Referências

ÁLVAREZ, M.; TAMAYO-CANUL, J.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; et al. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). **Animal Reproduction Science**, v.132, n.3-4, p.145-154, 2012.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L. *et al.* Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a comercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, p.895-907, 2004.

CAMPANHOLI, S.P.; MONTEIRO, F.M.; DIAS, E.A.R.D.; MERCADANTE, et al. Efeito da remoção do plasma seminal antes da criopreservação de sêmen bovino obtido por eletroejaculação na qualidade do sêmen e fertilidade *in vitro*. **Theriogenology**, v.89, p.114–121, 2017.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed., Belo Horizonte, 2013.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

EVANGELISTA, L.S.M.; LOPES, S.T.P.; SOUSA FILHO, M.C.; et al. Cinética de espermatozoides criopreservados de cães obtidos por técnicas de recuperação epididimária. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.44, n.2, p.57-63, 2020.



GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; et al. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and post-mortem collection. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.160-168, 2009.

LOPES, S.T.P.; SOUSA FILHO, M.A.C.; SILVA, J.H.L.; et al. Eficiência de duas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.5, p.1758-1766, 2020.

MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, n.3, p.471-485, 2006.



EFEITO DO ÁCIDO α -LIPOICO E DA L-ARGININA NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS

EFFECT OF α -LIPOIC ACID AND L-ARGININE ON *IN VITRO* PRODUCTION OF SHEEP EMBRYOS

Beatriz Cavalcanti de FREITAS^{1*}; Jossimara de Melo SILVA¹; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹.

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), Campus Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNVASF), Campus Ciências Agrárias (CCA), Petrolina, PE, 56300-000, Brasil.

*E-mail: beatrizcfreitas2@hotmail.com

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of α -lipoic acid on *in vitro* maturation and of L-arginine on *in vitro* fertilization of oocytes for *in vitro* production of sheep embryos. Thus, the ovaries were collected at a local slaughterhouse and the oocytes collected by the method of follicular aspiration with a vacuum pump and were divided equally into five maturation groups: CON, without addition of antioxidant; CIS group, with cysteamine as an antioxidant source; and the groups ALA5, ALA10 and ALA20, containing concentrations of 5.0, 10.0 and 20.0 μ M of ALA. After 24h of maturation, the oocytes were evaluated concerning occurrence and degrees of expansion of the cumulus cells. The oocytes of the best IVM group were destined for *in vitro* fertilization (IVF). The selected and capacitated sperm were included in five groups: CON, without addition of capacitator agent; HEP group, with heparin as a capacitator source; and ARG10, ARG20 and ARG50 groups, where IVF occurred in the same HEP medium, replacing heparin with 10 mM, 20 mM and 50 mM L-arginine, respectively. The results were expressed as a percentage and the variables of cumulus cell expansion and number of cleaved structures were compared using the chi-square test in Epi Info software (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, USA, 2021). Results were considered significant when $P < 0.05$. Regarding the expansion of cumulus cells all groups showed 100% expansion, on the total expansion category of COC it was observed that ALA5 and ALA20 groups did not present the same proportion of COC with total expansion as CIS group. After *in vitro* fertilization (IVF), there were no statistical differences in relation to the cleaved structures between CON, HEP, ARG5 and ARG10 groups. However, it was also observed that the use of 20.0 mM of L-arginine reduced the percentage of cleaved structures when compared to the ARG10 group ($P < 0.05$).

Keywords: Antioxidant, IVP, Oocyte, Sheep, Zygote.

Introdução

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas para o melhoramento das etapas da produção *in vitro* (PIV) de embriões, contribuindo, conseqüentemente, para os grandes avanços dessa



biotecnologia. Dentre os avanços, relatos recentes apontam o uso de substâncias com ações antioxidante e de capacitação espermática, as quais melhoram a qualidade dos meios de maturação e fecundação *in vitro*, respectivamente. Componentes alternativos com efeitos antioxidantes têm sido utilizados, como ácido α -lipóico (ALA), o qual, ao ser incluso em meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, melhorou a maturação e fecundação oocitária (HASSAN *et al.*, 2017). Santana *et al.* (2016) comprovaram que a L-arginina pode ser usada como um agente de capacitação alternativo tão eficaz quanto a heparina para a FIV na espécie bovina. Contudo, ainda são escassos os estudos do efeito do ácido α -lipóico na maturação *in vitro* e da L-arginina na fecundação *in vitro* de oócitos ovinos.

Material e métodos

Foram utilizados ovários ovinos obtidos de abatedouro local que foram transportados no período de 1 hora, em solução de NaCl 0,9%, a temperatura de 33°C e 34°C. Para a colheita dos complexos cumulus-oócitos (CCO), foi utilizada uma bomba de vácuo a uma pressão de 5 mL/min, agulha 18G utilizando meio de aspiração. Logo após a colheita, os CCO foram dispostos no meio de manipulação, sendo selecionados, para a maturação *in vitro*, os de Graus I e II. Após isso, foram divididos em cinco grupos de maturação: grupo CON, em que os CCO foram imersos em meio composto de TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 μ g de anfotericina B, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 UI/mL de eCG e 1 μ g/mL de estradiol; grupo CIS, os CCO foram imersos no meio do grupo CON mais 100 μ M de cisteamina; e grupos ALA5, ALA10 e ALA20, os quais os CCO, também, foram inclusos no mesmo meio do grupo CON, mas contendo 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M de ácido α -lipóico, respectivamente. A MIV ocorreu por 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, com 5% de CO₂. Os CCO foram considerados maduros quando apresentaram expansão das células do cumulus. Após a MIV, os oócitos seguiram para a fecundação *in vitro*. Inicialmente, o sêmen foi colhido de um carneiro com fertilidade comprovada através do método de vagina artificial. Posteriormente, ele foi disposto em cima de uma coluna de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram selecionados por centrifugação e foi ajustada a concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL, em 75 μ L/gota de meio FIV. Somente os oócitos maduros (n = 15) provenientes do melhor grupo de MIV e os espermatozoides selecionados foram inclusos nas gotas de FIV, que foram subdivididos nos seguintes grupos: CON, composto por oócitos maduros e espermatozoides, imersos em gotas de



50 µL de meio SOF®, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 10% de soro de ovelha em estro e 10 µg/mL de hipotaurina; grupo HEP, composto por oócitos maduros e espermatozoides imersos em gotas de 50 µL de meio CON, suplementado com 10 µg/mL de heparina; e nos grupos ARG 5, ARG10 e ARG20, em que a FIV ocorreu no mesmo meio CON, incluindo 5 mM, 10 mM e 20 mM de L-arginina, respectivamente. A FIV ocorreu entre 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. Os presumíveis zigotos foram submetidos à sucessivas pipetagens em meio SOF-cultivo, para remoção das células do cumulus e foram cultivados, por 48 h, fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com 3 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), penicilina, estreptomicina e anfotericina. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem e as variáveis de graus de expansão das células do cumulus e número de estruturas clivadas foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando P < 0,05.

Resultados e discussão

Com relação à expansão das células do cumulus, todos os grupos apresentaram 100% de expansão (Tabela 1). A suplementação dos meios de maturação com ou sem antioxidantes não provocou diferença na expansão das células do cumulus.

Tabela 1 – Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* sem a presença de antioxidantes (CON) ou na presença de cisteamina (CIS) ou de ácido α-lipoico (ALA5; ALA10; ALA20).

Grupos	Nº de CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)		
			Total	Moderado	Leve
CON	75	100 (75/75)	33,3 (25/75) _{Aab}	46,7 (35/75) _{Ba}	20 (15/75) _{ABb}
CIS	75	100 (75/75)	16 (12/75) _{BCc}	52 (39/75) _{Ba}	32 (24/75) _{Ab}
ALA 5	75	100 (75/75)	20 (15/75) _{ABb}	46,7 (35/75) _{Ba}	33,3 (25/75) _{Aab}
ALA 10	75	100 (75/75)	8 (6/75) _{cb}	74,7 (56/75) _{Aa}	17,3 (13/75) _{Bb}
ALA 20	75	100 (75/75)	17,3 (13/75) _{BCb}	54,7 (41/75) _{Ba}	28 (21/75) _{ABb}

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma coluna (P < 0,05). ^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma linha (P < 0,05).



Hassan *et al.* (2017) demonstraram que a concentração 10 μM apresentou superioridade, quando comparada às demais em bovinos, e em suínos Kang e Hyun (2017) demonstraram que a concentração de 50 μM apresentou superioridade quanto as demais em teste, mostrando que parece existir diferenças entre as espécies, em relação à necessidade de antioxidantes. No nosso protocolo, todos os grupos de tratamento tinham em sua composição substâncias que podem ter influenciado nessa expansão. Exemplos delas são: o estradiol, o eCG e o EGF. Esses hormônios foram utilizados em todos os grupos de tratamentos e diversos relatos na literatura demonstram que eles auxiliam nos processos de expansão das células do cumulus.

Com relação a expansão das células do cumulus, todos os grupos apresentaram 100% de expansão, e na categoria de expansão total observou-se que os grupos ALA5 e ALA20 apresentaram a mesma proporção de CCO com expansão total que o grupo CIS ($P < 0,05$), porém se observa que há uma tendência de queda de estruturas com expansão total quando os antioxidantes foram utilizados (Tabela 1). Guemra *et al.* (2013), em bovinos, mostraram que, ao usar o antioxidante quercetina, ocorreu redução das taxas de maturação. E Souza (2015), ao usar concentrações crescentes de Vitamina E em oócitos ovinos, mostrou uma tendência de queda na taxa de maturação. Outro ponto é que, como o ALA tem uma ação de regenerar outros antioxidantes, ele pode ter potencializado os componentes presentes no nosso meio base o que pode ter potencializado o estresse oxidativo. Como não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos dados de maturação, foi decidido que a concentração do grupo ALA5 seria utilizada para a maturar os oócitos que seguiram para a FIV, já que todas as concentrações traziam o mesmo efeito, foi preferível levar em consideração a melhor relação custo-benefício, optando, portanto, pela menor concentração, ou seja, 5 μM . O grupo controle não foi escolhido porque ele não estava sendo avaliado, por se tratar de um meio comercial

Após a fecundação *in vitro* (FIV), foi possível identificar que não houve diferenças estatísticas em relação às estruturas clivadas, entre os grupos CON, HEP, ARG5 e ARG10. Contudo, também foi observado que o uso de 20 mM de L-arginina reduziu o percentual de estruturas clivadas quando comparado ao grupo ARG10 ($P < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Taxa de clivagem (%) após fecundação *in vitro* de oócitos maturados sem a presença de antioxidantes e sem a presença de capacitador espermático (CON), com a presença de heparina como capacitador espermático (HEP) e maturados com ácido α -lipoico 5 μM e de L-arginina como capacitador espermático (ARG5; ARG10; ARG20).



Tratamentos	Oócitos maturados	% de clivados
CON	65	29,3 (19/65) ^{AB}
HEP	65	30,8 (20/65) ^{AB}
ARG 5	65	27,7 (18/65) ^{AB}
ARG 10	65	41,5 (27/65) ^A
ARG 20	65	23,1 (15/65) ^B

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam comparações na mesma coluna (P<0,05).

Notavelmente neste estudo a concentração mais alta de L-arginina (20 mM) foi prejudicial ao desenvolvimento embrionário, o que indica que a utilização desta substância em altas concentrações no meio de FIV pode ter um efeito negativo sobre espermatozóides, oócitos ou ambos. Estudos futuros devem separar os efeitos do uso de ARG em oócitos. Altas concentrações de L-arginina parecem também prejudicar o desenvolvimento embrionário em bovinos como documentado por Santana *et al.* (2016).

Nossos resultados corroboram os achados por Santana *et al.* (2016), que, usando a ARG, encontraram como resultado que a concentração 10 mM apresentou maior superioridade, porém, no seu meio FIV, não tinha o componente SOE, que estava presente no nosso meio e que pode ter influenciado nos resultados.

Conclusão

O meio MIV, em ovinos, suplementado com EGF, Estradiol e eCG, parece não necessitar de antioxidantes adicionais, como o ALA e a cisteamina. Além disso, o meio FIV, em ovinos, suplementado com soro de ovelha em estro e hipotaurina, parece não necessitar de agentes capacitantes adicionais, como a L-arginina e a heparina. São necessários mais estudos a fim de avaliar o efeito antioxidante do uso isolado do ácido alfa-lipóico ou em associação com os demais componentes do meio MIV assim como, do uso isolado da L-arginina ou em associação com os demais componentes do meio FIV na produção *in vitro* de embriões ovinos.

Referências

GUEMRA, S.; MONZANI, P.; S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA, P.R. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com



quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1616-1624, 2013.

HASSAN, B. M. S.; FANG, X.; ROY, P. K.; SHIN, S. T.; CHO, J. K. Effect of alpha lipoic acid as an antioxidant supplement during *in vitro* maturation medium on bovine embryonic development. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 123-130, 2017.

KANG, Young-Hun; HYUN, Sang-Hwan. Effect of Alpha Lipoic Acid on *in vitro* Maturation of Porcine Oocytes and Subsequent Embryonic Development after Parthenogenetic Activation. **Journal Of Animal Reproduction And Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 267-274, 29 dez. 2017.

SANTANA, P.P.B.; SILVA, B.B. da; SILVA, T.V.G.; COSTA, N.N.; CORDEIRO, M. S.; SANTOS, S.S.D.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S. Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1132-1138, 2016.

SOUZA, T. T. S. **Produção *in vitro* de embriões ovinos na presença de cafeína e vitamina E**. 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2015. Orientador: Dr. Edilson Soares Lopes Júnior.



EFEITO DO ÁCIDO TRANS-FERÚLICO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE ZIGOTOS OVINOS

EFFECT OF TRANS-FERULIC ACID ON *IN VITRO* PRODUCTION OF SHEEP ZYGOTES

Beatriz Cavalcanti de FREITAS^{1*}; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Jossimara de Melo SILVA¹; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹.

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), Campus Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNVASF), Campus Ciências Agrárias (CCA), Petrolina, PE, 56300-000, Brasil.

*E-mail: beatrizcfreitas2@hotmail.com

Abstract

The objective of this work was to evaluate the use of trans-ferulic acid in the *in vitro* maturation of oocytes and in the subsequent *in vitro* production of sheep embryos. For this, oocytes were collected from ovaries obtained from a local slaughterhouse, using a vacuum pump, which, soon after, were classified and taken to the IVM, where they were divided into five treatment groups: the CON group, in which the cumulus oocyte complexes (CCO) were immersed in medium containing TCM-199, supplemented with 500 IU penicillin, 0.5 mg streptomycin, 1.25 µg amphotericin, 0.2 mM sodium pyruvate, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 10 ng/mL of epidermal growth factor (EGF), 10 IU/mL of eCG and 1 µg/mL of estradiol; the CIS group, where the same maturation medium used in the CON group was used, however, supplemented with 0,1 mM of cysteamine; in the ATF10, ATF50 and ATF100 groups, the oocytes were also matured in the presence of the CON group medium, however, 10 µM, 50 µM and 100 µM of trans-ferulic acid were included, respectively. The oocytes with the medium were incubated for 24 h at 38.5 °C with 5% CO₂ in a culture oven. Then, *in vitro* fertilization (IVF) was performed, where IVF medium was used together with the selected and capacitated sperm. After that, the *in vitro* culture (IVC) of the presumptive zygotes was performed, which took place in SOF medium with 2 mg/mL of BSA, and the cleaved structures rate, after 48h of culture, was evaluated. Data were presented in percentage and the chi-square test was used in Epi Info software. The results were considered significant when P<0.05. It was possible to observe that the ATF100 had a higher expansion rate when compared to the treatments CON, CIS and ATF10, it was similar in the ATF50 treatment. Regarding the degrees of expansion, number of presumptive zygotes and cleaved structures, there was no significant difference between the treatment groups tested. It is possible to conclude that the addition of 100 µM of trans-ferulic acid improves the rate of expansion of cumulus cells, trans-ferulic acid promotes similar rates of presumptive zygotes and cleaved structures when compared to the use of the antioxidant cysteamine.

Key-words: Antioxidant, IVF, IVM, IVP, Sheep.

Introdução

O processo de produção *in vitro* de embriões (PIV) simula o processo de desenvolvimento embrionário no sistema reprodutivo feminino *in vivo*, sendo uma biotecnologia que consiste na



produção assistida de embriões em laboratórios até a fase embrionária desejada e que possibilita acelerar o ganho genético e aumentar o potencial reprodutivo de ovinos (LIMAVERDE; RONDINA; FREITAS, 2003). Ao longo da PIV, os oócitos e embriões são expostos a elevadas concentrações das espécies reativas de oxigênio (ERO), por conta da tensão de oxigênio, exposição à luz e do excesso de manipulação de oócitos ou embriões (SOVERNIGO *et al.*, 2017). Em elevadas concentrações, as ERO resultam em apoptose celular (ANDRADE *et al.*, 2010), gerando um desenvolvimento defeituoso e retardo do crescimento embrionário (AGARWAL; SALEH; BEDAIWY, 2003).

Visando diminuir o estresse oxidativo nos oócitos, são utilizados antioxidantes durante a MIV, a qual é uma etapa crucial que determinará a quantidade de oócitos que vão chegar até o estágio de blastocisto, após a FIV (MORAES, 2018). Antioxidantes, tais como a vitamina C e a vitamina E, são exemplos que demonstraram efeitos benéficos na MIV (CRHA *et al.*, 2003). Outro exemplo de substância é o ácido trans-ferúlico, o qual tem atraído a atenção por sua capacidade antioxidante e benefícios à saúde humana (KADOMA; FUJISAWA, 2008). Ao ser adicionado no meio de maturação de oócitos suínos, o ácido trans-ferúlico promoveu o aumento no potencial antioxidante na taxa de maturação, fecundação, e formação de blastocisto (TANIHARA *et al.*, 2018). Contudo, ainda são escassos os estudos sobre a utilização do ácido trans-ferúlico nos meios de MIV de oócitos ovinos em relação à maturação e produção de embriões *in vitro*. Dessa maneira, é relevante que seja estudada a função desse poderoso antioxidante nos oócitos, a fim de buscar melhorias para essa biotécnica tão importante que é a PIV.

Material e métodos

Os oócitos foram obtidos de ovários colhidos em matadouro local. Foi utilizada bomba de vácuo para obtenção dos oócitos, os quais, em seguida, foram classificados e encaminhados à MIV. Foram divididos em cinco grupos: Grupo CON, contendo TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 UI/mL de eCG e 1 µg/mL de estradiol, grupo CIS, com meio mesmo meio do grupo CON, mas adicionando 0,1 mM de cisteamina; e os grupos ATF10, ATF50 e ATF100, os quais os oócitos foram amadurecidos também o mesmo meio do grupo CON e incluindo 10 µM, 50 µM e 100 µM de ácido trans-ferúlico, respectivamente. Os oócitos foram incubados por 24 h a 38,5 °C, com 5%



de CO₂. Após isso, foi avaliada a expansão das células do cumulus e os oócitos seguiram para a fecundação *in vitro* (FIV), onde foi utilizado meio de FIV, juntamente com espermatozoides selecionados por um período de 18 a 20 horas, nas mesmas condições da MIV. Após isso, os presumíveis zigotos foram desnudados através de sucessivas pipetagens e avaliados quanto à presença do 2º corpúsculo polar no espaço perivitelínico, usando um microscópio invertido. Após avaliação, os presumíveis zigotos foram para CIV, com meio SOF suplementado com 3 mg / mL de BSA e, a partir disso, foram avaliados quanto à ocorrência de clivagem após o período de 48 h. Os dados foram apresentados em porcentagem e as variáveis foram comparadas usando o teste de Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Com relação à taxa de expansão, no grupo ATF100 foi observado uma maior proporção de CCO expandidos, quando comparado aos grupos CON, CIS e ATF10 ($P < 0,05$) (Tabela 1). Já com relação aos graus de expansão, não houve diferença significativa entre grupos de tratamento, dentro de cada grau avaliado (total; moderado; leve). Da mesma forma, porém comparando os graus de expansão, dentro de cada grupo de tratamento, não foi verificada diferença significativa entre os graus de expansão ($P > 0,05$), com exceção do grupo CIS, onde a proporção de CCO com expansão moderada se mostrou maior que com aquela de CCO com expansão total ($P < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* sem a presença de antioxidantes (CON) ou na presença de cisteamina (CIS) ou de ácido trans ferúlico (ATF10; ATF50; ATF100).

Grupos	Nº de CCO I e II	Taxa de expansão % (n)	Grau de expansão % (n)		
			Total	Moderado	Leve
CON	43	81,4 (35/43) ^{bc}	28,6 (10/35) ^{aA}	37,1 (13/35) ^{aA}	34,3 (12/35) ^{aA}
CIS	43	79,1 (34/43) ^{bc}	23,5 (8/34) ^{aB}	47,1 (16/34) ^{aA}	29,4 (10/34) ^{aAB}



ATF 10	43	76,7 (33/43) ^c	30,3 (10/33) _{aA}	24,2 (8/33) ^{aA}	45,5 (15/33) _{aA}
ATF 50	43	93,0 (40/43) ^{ab}	25,0 (10/40) _{aA}	40,0 (16/40) _{aA}	35,0 (14/40) _{aA}
ATF 100	43	95,3 (41/43) ^a	24,4 (10/41) _{aA}	36,6 (15/41) _{aA}	39,0 (16/41) _{aA}

^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma coluna (P<0,05). ^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma linha (P<0,05).

Com base nos resultados experimentais, pode-se perceber que o efeito antioxidante do ácido trans-ferúlico age de forma semelhante ao grupo suplementado com cisteamina, no qual o grupo ATF 100 se mostrou superior em relação à taxa de expansão. A explicação para esse fato é que o ácido trans-ferúlico tem o grupo de ácido carboxílico que age evitando que os radicais livres danifiquem a membrana celular, através da peroxidação lipídica pela ligação da bicamada lipídica da membrana celular. Além disso o ácido trans-ferúlico, quando absorvido pelo corpo, tem ação de maior duração, quando comparado a outros antioxidantes, como, por exemplo, a vitamina C (SRINIVASAN; SUDHEER; MENON, 2007).

No entanto, com relação aos graus de expansão, não houve diferença significativa entre grupos de tratamento, dentro de cada grau avaliado (total; moderado; leve). Contudo, quando comparados os tratamentos, o CIS demonstrou menor proporção de estruturas com expansão total quando comparado àqueles de grau moderado, podendo ser um indicativo que o número de replicatas foi baixo, sendo necessário um número maior de sessões para uma melhor avaliação da substância na MIV.

Não houve diferença estatística em relação à porcentagem de presumíveis zigotos no presente trabalho. Contudo, é possível observar uma tendência de crescimento do número de presumíveis zigotos no tratamento ATF 50 e ATF 100, assim como na taxa de estruturas clivadas.

Tabela 2 – Taxa de presumíveis zigotos e estruturas clivadas (%) após fecundação *in vitro* de oócitos maturados sem a presença de antioxidantes (CON), com cisteamina (CIS) e na presença de ácido trans ferúlico (ATF10; ATF50; ATF100).

Tratamentos	Oócitos Maturados	% de presumíveis Zigotos	% de clivados
CON	43	23,3 (10/43)	37,2 (16/43)



CIS	43	20,9 (9/43)	23,3 (10/43)
ATF 10	43	16,3 (7/43)	34,9 (15/43)
ATF 50	43	30,2 (13/43)	39,5 (17/43)
ATF 100	43	27,9 (12/43)	41,9 (18/43)

P > 0,05.

A explicação para não haver diferença entre os grupos de tratamento pode estar relacionada a um número baixo de repetições, resultando em baixo número de oócitos que seguiram para a fecundação. Porém, há estudos que demonstram a eficácia do ácido ferúlico na reprodução de machos, auxiliando na viabilidade espermática de sêmen humano (ZHENG; ZHANG, 1997).

Conclusão

A adição de 100 μ M de ácido trans-ferúlico melhora a taxa de expansão de células do cumulus. O ácido trans-ferúlico promove taxas semelhantes de presumíveis zigotos e de estruturas clivadas quando comparado a utilização do antioxidante cisteamina.

Referências

- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829–843, 2003.
- ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.
- CRHA, I.; HRUBA, D.; VENTRUBA, P.; FIALA, J.; TOTUSEK, J.; VISNOVÁ, H. Ascorbic acid and infertility treatment. **Central European Journal of Public Health**, v. 11, p. 63–67, 2003.
- KADOMA, Y.; FUJISAWA, S., A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoethanol, a thiol, using the induction period method. **Molecules**, v. 13, p. 2488-2499, 2008.
- LIMAVERDE, J. B.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Produção *in vitro* de embriões ovinos. **Ciência Animal**, v. 13, p. 79-87, 2003.
- MORAES, M. E. B. **Produção *in vitro* de embriões bovinos suplementada com antioxidantes: efeito no desenvolvimento embrionário e na taxa de prenhez**. 2018. p. 68, Dissertação (Mestre Saúde e Produção de Ruminantes) - UNOPAR, Arapongas, 2018.



SOVERNIGO, T. C.; ADONA, P. R.; MONZANI, P. S.; GUEMRA, S.; BARROS, F. D. A.; LOPES, F. G.; LEAL, C. L. V. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 561-569, 2017.

SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid: therapeutic potential thorough its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 40, p. 92-100, 2007.

TANIHARA, F.; HIRATA, M.; NHIEN, N.; HIRANO, T.; KUNIHARA, T.; OTOI, T. Effect of ferulic acid supplementation on the developmental competence of porcine embryos during *in vitro* maturation. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.80, n.6, p. 1007- 1011, 2018.

ZHENG, R. L.; ZHANG, H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, p. 581-586, 1997.



EFEITO DO ALL TRANS RETINAL NA MATURAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES OVINOS

EFFECT OF ALL TRANS RETINAL ON *IN VITRO* MATURATION ON THE *IN VITRO* PRODUCTION OF SHEEP EMBRYOS

Luana Kealy Pimentel de OLIVEIRA^{1*}; Andreza Mayara Carneiro LIMA¹; Érika Karoline de Oliveira AURELIANO¹; Jossimara de Melo SILVA¹; Beatriz Cavalcanti de FREITAS¹; Paulo Ricardo Vieira da SILVA¹; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), Campus Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNVASF), Campus Ciências Agrárias (CCA), Petrolina, PE, Brasil.

*E-mail: luanakealy1@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of inclusion of all trans retinal (RAL) on the *in vitro* maturation of sheep oocytes. For this, the oocytes were collected, selected and divided equally into maturation groups: CON group, without the use of antioxidants; the CIS group, containing cysteamine as an antioxidant agent; in the RAL1.5, RAL3 and RAL6 groups, 1.5 μM , 3.0 μM and 6.0 μM of RAL were added, respectively, as an antioxidant source. The COCs were placed in IVM medium, under mineral oil, for 24 hours in a cultivation oven at 38.5°C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After maturation, the expansion of cumulus cells and the formation of presumptive zygotes were evaluated. Data were presented in percentage and the chi-square test was used in Epi Info software. Differences were considered significant when $P < 0.05$. The RAL3.0 and RAL6.0 groups showed a total expansion of cumulus cells equal to the CIS group. Regarding the moderate degree of cumulus cells, it was possible to observe that the RAL6.0 group was significantly lower than the other groups, which did not differ from each other. When observing the degree of light expansion of cumulus cells, it was possible to identify that the RAL6.0 group had a higher proportion ($P < 0.05$) in this parameter when compared to the rest of the treatments. After *in vitro* fertilization (IVF), it was possible to observe that the RAL1.5 and CIS groups were equal in relation to the formation of presumptive zygotes, but only the RAL1.5 group was greater than the CON group. Thus, it was possible to conclude that RAL positively influences the IVP of sheep embryos and presented antioxidant potential similar to cysteamine, which is considered an antioxidant with proven activity.

Keywords: Antioxidant, IVP, Oocyte, Retinoids.

Introdução

Um dos aspectos que influencia a Produção *In Vitro* de Embriões (PIV) ovina são os componentes presentes no meio de maturação. Atualmente, antioxidantes estão sendo utilizados nos meios de maturação *in vitro* (MIV) com a função de controlar a alta produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem causar estresse oxidativo, reduzindo a qualidade do oócito, afetando, assim, a eficiência do processo da MIV. Dentre os antioxidantes, destaca-se o all trans



retinal (RAL), que já tem diversos efeitos positivos em relação ao seu efeito antioxidante. Em camundongos diabéticos, RAL melhorou a disfunção dos fotorreceptores por meio de um mecanismo antioxidante (BERKOWITZ *et al.*, 2015). Através desses resultados percebe-se a importância de avaliar de forma mais aprofundada quais os efeitos do RAL na MIV de oócitos e na consequente PIV de embriões ovinos, já que ainda não há relatos da sua utilização na MIV, podendo melhorar a eficiência dessa biotécnica.

Material e Métodos

Para a colheita dos oócitos foi utilizada uma bomba de vácuo, através de ovários ovinos obtidos de abatedouro local. Logo após a colheita, os CCO foram selecionados e levados à MIV, sendo divididos em cinco grupos de maturação: grupo CON, composto de TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino, 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH e 1 µg/mL de estradiol; grupo CIS, os oócitos foram maturados no mesmo meio do grupo CON, suplementado com 100 µM de cisteamina; e os grupos RAL1,5, RAL3 e RAL6, em que foi utilizado o mesmo meio do grupo CON, suplementado com 1,5, 3,0 e 6,0 µM de RAL, respectivamente. As gotas de MIV foram cobertas com óleo mineral e incubadas durante 24 horas, a 38,5°C e 5% de CO₂. Após isso, foi avaliada a ocorrência de expansão e o grau de expansão das células do cumulus e depois, seguiram para a fecundação *in vitro* (FIV). O sêmen utilizado na FIV foi colhido através do método de colheita por vagina artificial a partir de 1 carneiro com fertilidade comprovada. A FIV foi realizada por um período de 18 a 20 horas, em incubadora, a 38,5°C, com atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂. Os presumíveis zigotos foram avaliados quanto à presença do 2º corpúsculo polar no espaço perivitelínico, utilizando um microscópio invertido (BEL INV-100®; BEL, São Paulo, Brasil). As variáveis de graus de expansão das células do cumulus e número de presumíveis zigotos foram expressos em porcentagens e comparados usando o teste qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021).

Resultados e Discussão

Em relação aos graus de expansão das células do cumulus, o grupo RAL1,5 apresentou a menor taxa de expansão total das células do cumulus quando comparado ao grupo CIS e RAL6,0 (P<0,05). Já os grupos RAL3,0 e RAL6,0 apresentaram expansão total das células do cumulus igual



ao grupo CIS. Em relação ao grau moderado das células do cumulus, foi possível observar que, o grupo RAL6,0 foi, significativamente, menor que os demais grupos ($P < 0,05$), os quais não diferiram entre si. Quando observado o grau de expansão leve das células do cumulus, foi possível identificar que o grupo RAL6,0 apresentou maior proporção ($P < 0,05$) nesse parâmetro quando comparado ao restante dos tratamentos.

Tabela 1 – Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* sem a presença de antioxidantes (CON) ou na presença de cisteamina (CIS) ou de all trans retinal (RAL1,5; RAL3,0; RAL6,0).

Grupos	Nº de oócitos	Grau de expansão % (n)		
		Total	Moderado	Leve
CON	68	22,0 ^{ABb}	56,0 ^{Aa}	22,0 ^{Bb}
CIS	61	31,1 ^{Aab}	45,9 ^{Aa}	23,0 ^{Bb}
RAL 1,5	59	15,2 ^{Bb}	62,8 ^{Aa}	22,0 ^{Bb}
RAL 3,0	63	23,8 ^{ABb}	50,8 ^{Aa}	25,4 ^{Bb}
RAL 6,0	61	31,2 ^{Aab}	24,6 ^{Bb}	44,2 ^{Aa}

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma coluna ($P < 0,05$).^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma linha ($P < 0,05$).

No processo de maturação ocorre a expansão das células do cumulus em que há a secreção de ácido hialurônico (AH) que promove o aumento significativo do volume do complexo cumulus oócito (CCO), caracterizando a expansão de células do cumulus (TANGHE *et al.*, 2002), contudo essa metodologia para avaliação de maturação não deve ser utilizada sozinha para identificar poócitos aptos a serem fecundados. Ao mesmo tempo em que o grupo RAL6,0 apresentou taxa semelhante de expansão total das células do cumulus, também apresentou a maior taxa de expansão leve das células do cumulus. O que faz entender que as utilizações de grandes quantidades do retinal devem ser melhores estudadas, pois ao mesmo tempo em que melhoram esse parâmetro, podem de outro lado, afetar algum processo. Essa mesma informação foi confirmada quando comparado os dados no mesmo grupo de tratamento, no qual demonstrou que o grupo RAL6,0 apresentou ao mesmo tempo, maiores taxas de grau leve e total ao mesmo tempo.

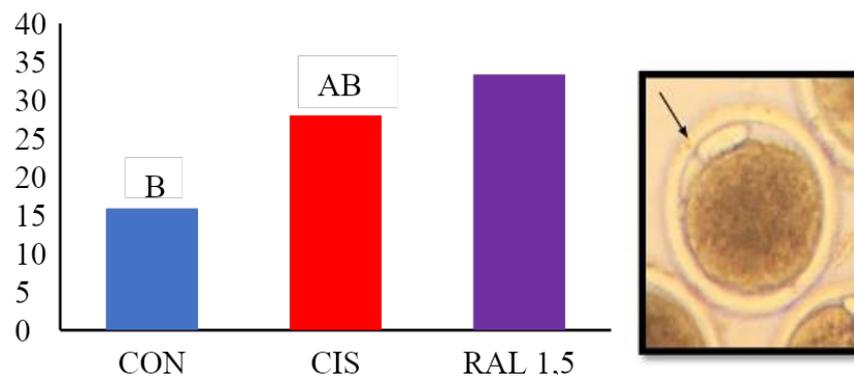
Concentrações de 10 nmol/L e 100 nmol/L de ácido retinóico, um retinóide bastante estudado, mostraram maior sobrevivência em oócitos caprinos, já a sobrevivência do grupo experimental sob concentração de 1000 nmol/L diminuiram drasticamente em comparação com

os outros grupos (PU *et al.*, 2014). A suplementação de ácido retinóico deve estar dentro da faixa fisiológica, pois sua exposição excessiva pode ter efeitos adversos (HUANG *et al.*, 2003). Como o retinal é também um retinóide, pode-se supor que altas concentrações podem ser prejudiciais.

Trabalhos anteriores do mesmo grupo de pesquisa desse presente trabalho demonstraram que a utilização de RAL na concentração de 1,5 μM trouxe maiores níveis de atividade mitocondrial e a utilização das concentrações de RAL demonstraram efeitos iguais aos da cisteamina, que é um antioxidante padrão, em relação aos dados de MII (OLIVEIRA, 2022). Dessa forma, levando em consideração esses dados, foi decidido que, seria importante identificar se os oócitos maturados na presença de 1,5 μM de RAL traria efeitos significativos quando fecundados. Dessa forma, foram fecundados oócitos maturados no grupo CON, CIS e RAL1,5.

Após a fecundação *in vitro* (FIV), foi possível observar que os grupos RAL1,5 e CIS foram iguais em relação a formação de presumíveis zigotos, mas somente o grupo RAL1,5 foi maior que o grupo CON ($P < 0,05$).

Figura 1 – Número de presumíveis zigotos após a fecundação *in vitro* dos oócitos maturados sem a presença de antioxidantes (CON), com a adição de cisteamina (CIS) ou de retinal (RAL1,5). $P > 0,05$. (CON: 15; CIS 25; RAL 1,5: 30)



A cisteamina é considerado um antioxidante com atividade comprovada em diversas espécies, e nesse estudo, o RAL demonstrou ter efeitos semelhantes à ela na etapa de MIV. Esses resultados continuaram após a FIV. Foi possível observar que o grupo RAL1,5 e CIS apresentaram resultados iguais quando observada a formação de presumíveis zigotos, porém, é importante salientar que o grupo RAL1,5 foi maior que o grupo CON, sem adição de antioxidantes, diferente do grupo CIS que se apresentou igual ao grupo CON. Com esses dados é possível observar uma certa tendência de que a utilização de RAL na MIV torna-se melhor que a utilização da cisteamina, além de que, a cisteamina tem somente papel antioxidante, enquanto que os retinóides, além de possuírem potencial antioxidante, também podem agir no processo de diferenciação celular, o que,



com mais estudos, podem gerar efeitos ainda melhores quando comparados a antioxidantes já testados, levando em consideração a procura de melhores concentrações e também, a adição deles em outras etapas da PIV.

Mais estudos, com um número maior de sessões de FIV e também avaliação de clivagens após um cultivo *in vitro* seriam necessários para avaliar melhor a influência do RAL na maturação de oócitos ovinos.

Conclusão

O all trans retinal influencia positivamente a PIV de embriões ovinos e apresentou potencial antioxidante semelhante à cisteamina, que é considerado um antioxidante com atividade comprovada. Sabendo que o RAL é um antioxidante com alto peso molecular e que, portanto, é utilizado em menores concentrações que a cisteamina, o RAL pode ser uma alternativa ao antioxidante comercial utilizado na maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Referências

BERKOWITZ, B.A.; KERN, T.S.; BISSIG, D.; PATEL, P.; BHATIA, A.; KEFALOV, V. J.; ROBERTS, R. Systemic retinaldehyde treatment corrects retinal oxidative stress, rod dysfunction, and impaired visual performance in diabetic mice. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v.56, p.6294-6306, 2015.

HUANG, F.J.; SHEN, C.C.; CHANG, S.Y.; WU, T.C.J.; HSUUW, Y.D. Retinoic acid decreases the viability of mouse blastocysts *in vitro*. **Human Reproduction**, v.18, n.1, p.130-136, 2003.

OLIVEIRA, L. K P. **Efeito do all trans retinal sobre a maturação *in vitro* de oócitos ovinos.** Dissertação (Mestrado acadêmico) – Programa de Pós Graduação em ciência animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2022.

PU, Y.; WANG, Z.; BIAN, Y.; ZHANG, F.; YANG, P.; LI, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; FANG, F.; CAO, H. All-trans retinoic acid improves goat oocyte nuclear maturation and reduces apoptotic cumulus cells during *in vitro* maturation. **Animal Science**, v., 85, p. 833-839, 2014.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S.A., STOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVEZ, P.B., WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, A.; CORYN, N.; DE KRUIUF, A. Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.414-424, 2002.



EFEITO DO ALL TRANS RETINAL SOBRE A MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS

EFFECT OF ALL TRANS RETINAL ON *IN VITRO* MATURATION OF SHEEP OOCYTES

Kealy Pimentel de OLIVEIRA^{1*}; Damaris Raquel Pires dos SANTOS¹; Paulo Ricardo Vieira da SILVA¹; Kíscyla Oliveira de ANDRADE²; Alane Pains Oliveira do MONTE²; Maria Helena Tavares de MATOS²; Mabel Freitas CORDEIRO¹; Edilson Soares LOPES JÚNIOR¹

¹Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), Campus Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNVASF), Campus Ciências Agrárias (CCA), Petrolina, PE, 56300-000, Brasil.

²Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia, Campus Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNVASF), Campus Ciências Agrárias (CCA), Petrolina - PE, Brasil.

*E-mail: luanakealy1@gmail.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the inclusion of all trans retinal (RAL) on the *in vitro* maturation of sheep oocytes. For this, the oocytes were collected, selected and divided equally into maturation groups: CON group, without the use of antioxidants; the CIS group, containing cysteamine as an antioxidant agent; in the RAL1.5, RAL3 and RAL6 groups, 1.5 μ M, 3.0 μ M and 6.0 μ M of RAL were added, respectively, as an antioxidant source. The COCs were placed in IVM medium, under mineral oil, for 24 hours in a cultivation oven at 38.5°C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂. After maturation, chromatin configuration, intracellular glutathione levels and mitochondrial activity were evaluated. Chromatin configuration and cumulus cell expansion data were presented in percentage and the chi-square test was used in Epi Info software. Data for GSH levels and mitochondrial activity were submitted to the Shapiro-Wilk test followed by the Kruskal-Wallis test for comparisons. When the main effects or interactions were significant, the means were compared using the Student-Newman-Keuls test, using the online statistical program SAS® On Demand for Academics 9.04.01 (SAS 3.8 Enterprise Edition, USA, 2020). Differences were considered significant when $P < 0.05$. Regarding the rate of nuclear maturation, the groups in which retinal was added did not differ significantly from the group in which cysteamine was used in relation to MII. There was no difference between groups when observing glutathione levels after maturation. Regarding mitochondrial activity data, the CON and RAL1.5 groups showed superior results when compared to the other groups, but they did not differ from each other. Thus, it is possible to conclude that RAL positively influences the *in vitro* maturation of oocytes, being an alternative to cysteamine as an antioxidant agent in the *in vitro* maturation of oocytes.

Keywords: Antioxidant. IVP. MII. Oocyte. Retinoids.

Introdução

Atualmente, diferentes antioxidantes vêm sendo utilizados no meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos com a função de controlar a alta produção das espécies reativas de oxigênio (ERO) e reduzir o estresse oxidativo (PANCARCI *et al.*, 2012).



Um exemplo de antioxidante que vem ganhando destaque é o all trans retinal (RAL), que foi utilizado em cosméticos dermatológicos para tratamento e prevenção das manifestações cutâneas produzidas pelo fotoenvelhecimento, reduzindo rugas, linhas finas, flacidez, melhorando o viço e a aparência geral, aumentando a quantidade de colágeno (ARRUDA *et al.*, 2012). Esses dados demonstram que é importante avaliar de forma mais aprofundada quais os efeitos do RAL na MIV de oócitos e na consequente PIV de ovinos. Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do RAL no meio de MIV sobre a taxa de MIV e sobre os níveis de glutathione intracelular e atividade mitocondrial após o processo de maturação de oócitos ovinos.

Material e Métodos

Para a colheita dos oócitos foi utilizada uma bomba de vácuo através de ovários ovinos obtidos de abatedouro local, utilizando uma bomba de vácuo. Logo após a colheita, os CCO foram selecionados e levados à MIV, sendo divididos em cinco grupos de acordo com o meio de maturação: grupo CON, composto de TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg de estreptomicina, 1,25 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino, 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10 µg/mL de FSH, 10 µg/mL de LH e 1 µg/mL de estradiol; grupo CIS, os oócitos foram maturados no mesmo meio do grupo CON, suplementado com 100 µM de cisteamina; e os grupos RAL1,5, RAL3 e RAL6, em que foi utilizado o mesmo meio do grupo CON, suplementado com 1,5, 3,0 e 6,0 µM de RAL, respectivamente. As gotas de MIV foram cobertas com óleo mineral e incubadas durante 24 horas, a 38,5°C e 5% de CO₂. Ao final do processo de maturação, os oócitos foram desnudados, incubados com Hoechst 33342 e foi realizada a avaliação de cromatina, em que foram verificados os diferentes estágios meióticos: Vesícula Germinativa (VG), Quebra da Vesícula Germinativa (QVG), Metáfase I (MI) e Metáfase II (MII). Em seguida, foram avaliados os níveis intracelulares de glutathione e a atividade mitocondrial nos grupos CON e CIS e nos grupos testes, com a utilização de RAL, nas concentrações de 1,5 µM e 6,0 µM. Para isso, os oócitos foram desnudos e incubados em PBS, suplementado com 10 mM de CellTracker® (4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxycumarina; e 100 mM de MitoTracker Red (CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Austrália), a 37°C, para detectar os níveis intracelulares de GSH e de atividade mitocondrial, através das fluorescências azul e vermelho, respectivamente (LINS *et al.*, 2016).



Resultados e Discussão

Os grupos utilizando o RAL como fonte antioxidante apresentaram-se iguais ao grupo CIS com relação ao percentual de MII (Tabela 1). Foi possível observar também que os tratamentos com antioxidante apresentaram menores taxas de oócitos em VG do que o grupo controle.

Tabela 1 – Estágios de maturação nuclear de oócitos ovinos maturados *in vitro* na ausência de antioxidante (CON) ou na presença de cisteamina (CIS) ou de retinal (RAL).

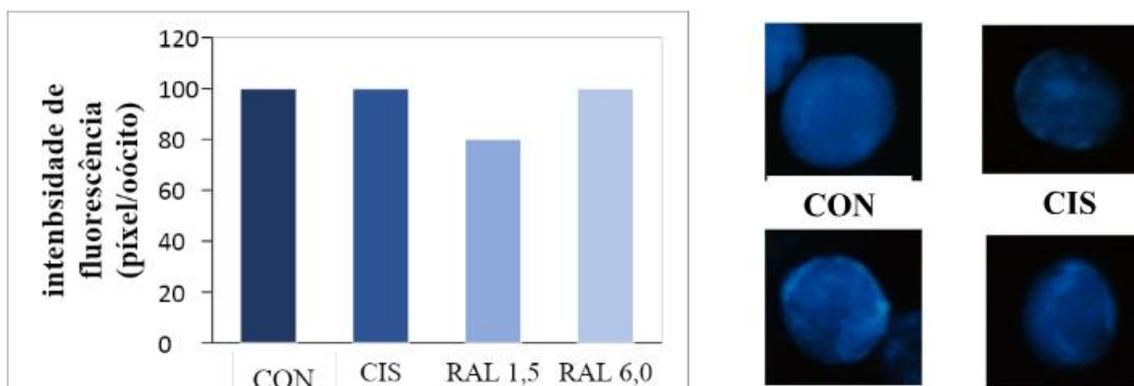
Grupos	Configuração da cromatina % (n)			
	VG	QVG	MI	MII
CON	58,0 (29/50) ^{Aa}	18,0 (9/50) ^{ABb}	14,0 (7/50) ^{Bb}	10,0 (5/50) ^{Bb}
CIS	6,2 (3/48) ^{Bc}	25,0 (12/48) ^{Ab}	45,8 (22/48) ^{Aa}	23,0 (11/48) ^{ABb}
RAL 1,5	16,0 (8/50) ^{Bb}	16,0 (8/50) ^{ABb}	46,0 (23/50) ^{Aa}	22,0 (11/50) ^{ABab}
RAL 3,0	16,0 (8/50) ^{Bb}	10,0 (5/50) ^{Bb}	48,0 (24/50) ^{Aa}	26,0 (13/50) ^{Ab}
RAL 6,0	14,0 (7/50) ^{Bb}	20,0 (10/50) ^{ABab}	34,0 (17/50) ^{Aa}	32,0 (16/50) ^{Aa}

^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma coluna ($P < 0,05$).^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma linha ($P < 0,05$). VG: Vesícula Germinativa; QVG: Quebra da Vesícula Germinativa; MI: Metáfase I; Metáfase II.

Após analisar esses dados, seguiram para as avaliações de níveis intracelulares de glutathione e de atividade mitocondrial somente os grupos de controles positivos e negativos: CON o grupo CIS e os grupos testes, com a utilização de RAL, nas concentrações de 1,5 μM e 6,0 μM . Como na configuração da cromatina não foi observada diferença entre os grupos contendo RAL, foi decidido que, para as próximas análises, seria utilizado a menor concentração (já que esta tem efeitos iguais às outras doses testadas) e a maior concentração, com o intuito de entender se o retinal se comporta como os outros retinóides, os quais demonstram que em maiores concentrações podem ser tóxicos e influenciam nos parâmetros relacionados aos níveis de potencial mitocondrial e glutathione intracelular.

No tocante à emissão de fluorescência quantificada através do número de pixels, os níveis intracelulares oocitários de GSH não apresentaram diferença entre os grupos (Figura 1).

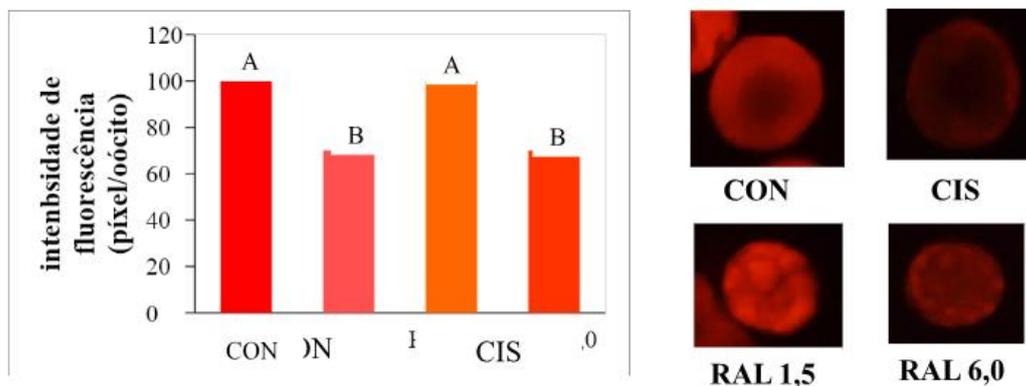
Figura 1 – Níveis intracelulares de GSH (pixel/oócito) de oócitos maturados na ausência de antioxidantes (CON) ou na presença de cisteamina (CIS), ou de RAL (RAL1,5 e RAL 6,0). $P > 0,05$. (CON: 51 ; CIS: 57; RAL1,5: 54; RAL6,0: 49).



Segundo Mertens *et al.* (2005), a adição de EGF ao meio de MIV estimula a síntese de GSH intracelular em oócitos de vaca e de novilha. Dessa maneira, no presente estudo, é possível que todos os grupos tenham apresentado níveis iguais de GSH tanto por conta da função do EGF como pelos efeitos dos antioxidantes utilizados nos grupos que receberam essa adição.

Com relação à atividade mitocondrial, os oócitos maturados nos grupos CON e RAL 1,5 foram significativamente superiores ($P < 0,05$) aos grupos CIS e RAL6,0 (Figura 2). A explicação para maiores níveis de mitocôndrias ativas no grupo CON é que, por não ter a adição de um antioxidante, houve uma compensação dos próprios oócitos, sendo necessária uma maior atividade mitocondrial para produzir uma maior quantidade de ATP para que a célula continuasse viva e tentasse retomar a meiose. No oócito, a ATP é fundamental para a síntese de proteínas, proporcionando a continuidade do processo de maturação e desenvolvimento embrionário (STOJKOVIC *et al.*, 2001).

Figura 2 – Níveis intracelulares da atividade mitocondrial (pixel/oócito) de oócitos maturados na ausência (controle) ou na presença de Cisteamina, Retinal 1,5 e Retinal 6,0. (CON: 51; CIS: 57; RAL1,5: 54; RAL6,0: 49)



Já a diminuição desse potencial nos grupos CIS e RAL 6,0 pode estar relacionada ao desequilíbrio das fontes oxidantes e antioxidantes. Sabe-se que não é só a grande quantidade de ERO que traz o estresse oxidativo, mas sim, grandes quantidades de antioxidantes podem influenciar nesse desequilíbrio. Nesse caso, além do aumento do GSH através da utilização do EGF, também foram acrescentadas fontes antioxidantes (nesse caso, a cisteamina e o retinal). Dessa forma, seria necessário reduzir as concentrações dos antioxidantes, ou avaliar outras concentrações de RAL, ou avaliar se o EGF seria o fator de crescimento correto ao ser utilizado juntamente com grandes concentrações de antioxidantes.

Conclusão

O all trans retinal influencia positivamente a maturação *in vitro* de oócitos ovinos e melhora os níveis de atividade mitocondrial no processo, apresentando potencial antioxidante semelhante à cisteamina. São necessários mais estudos, testando o uso de outras avaliações (TUNEL, PCR, ERO) ou outras concentrações de RAL a fim de identificar melhor como age o all trans retinal na maturação do oócito ovino.

Agradecimentos

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.



Referências

ARRUDA, L. H. F.; ARRUDA, A. C. B. B.; STOCCO, P. L.; OTA, F. S. ASSUMPCÃO, E. C.; LANGEN, S. S.B.; COSTA, A. C; PARK, U. S.; MYASHIRO, C. H. V.; Avaliação de dermocosmético com retinaldeído, nicotinamida e *Vitis vinifera* no fotoenvelhecimento cutâneo de mulheres entre 25 e 40 anos de idade. **Surgical Cosmetic Dermatology**, v.4, p. 38-44, 2012.

LINS, T.L.B.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARROS, V.R.P.; BARBERINO, R.S.; BEZERRA, M.E.S.; MACEDO, T.J.; MATOS, M.H.T. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium maintaining the viability of sheep isolate secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263–270, 2016.

MERTENS, M.J.; LÓPEZ-BEJAR, M; PARAMIO, M.T. Intracytoplasmic glutathione levels in heifer oocytes cultured in different maturation media and its effect on embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 126-130, 2005.

PANCARCI, S.M.; ARI, U.Ç.; ATAKISI, O.; GÜNGÖR, O.; ÇİGREMİS, Y.; BOLLWEIN, H.; Nitric oxide concentrations, estradiol-17 beta progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal Reproduction Science**, v.130, n.1-2, p. 9-15, 2012.

STOJKOVIC, M., MACHADO, S.A., STOJKOVIC, P., ZAKHARTCHENKO, V., HUTZLER, P., GONÇALVES, P.B., WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.



EFEITO DO ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar coriaceum* Wittm) SOBRE PARÂMETROS DE ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE OVINOS

EFFECT OF PEQUI OIL (*Caryocar coriaceum* WITTM) ON THE PARAMETERS OF CRYOPRESERVED SPERMATOZOA OF RAM

Davi Felipe Soares COELHO^{1*}; Eduarda de Oliveira Machado RIBEIRO¹; Thiago Vitor Gomes de SALES¹; Thamyrys Myrela da Silva NASCIMENTO¹; Emilly Gabriele Correia Bezerra BRITO¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA²; Alexandre Rodrigues SILVA²; Gabriela Liberalino LIMA¹.

¹Departamento de Zootecnia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Crato, CE, Brasil; ²Departamento de ciências animais, Universidade federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil *davifscelho@gmail.com.

Abstract

Sperm cells, when undergoing cryopreservation processes, suffer from oxidation caused by reactive oxygen species (ROS), which causes damage to the cell membrane, affecting seminal quality. Ram semen has a certain sensitivity to these processes, requiring good extender protocols. In view of the antioxidant potential of pequi oil (OP), it appears to be a possible additive for semen cryopreservation extenders. Then, the objective of this work was to evaluate the effect of the addition of 5% OP on sperm parameters of ram semen after cryopreservation and thawing. Six breeder rams were used, four ejaculates from each one (n=24), which were cryopreserved and, after thawed, the parameters of spermatic total motility and progressive were evaluated. The treatments were divided in two, T0- control (ACP + 15% egg yolk + 6% glycerol); and T1- control + 5% OP. The results obtained showed better values of T1 comparing to T0, in both parameters evaluated, showing statistical difference ($p < 0.05$). Therefore, the addition of OP was able to protect the sperm and maintain the integrity of the cell membrane.

Keywords: antioxidant, cryopreservation, spermatozoon.

Introdução

A criopreservação de sêmen é uma técnica de conservação de material genético que traz inúmeras vantagens a outras biotécnicas reprodutivas, como a inseminação artificial (IA) e produção *in vitro* de embriões (PIVE). Apresenta vantagens, principalmente na disseminação de material genético de qualidade, colabora no incremento de programas de melhoramento genético e permite a conservação de material genético de linhagens transgênicas. Entretanto, apesar das suas vantagens e, mesmo diante do aprimoramento da técnica, em ovinos as taxas de fertilização obtidas com sêmen criopreservado ainda são baixas quando comparadas ao uso do sêmen fresco (BERGSTEIN-GALAN *et al.*, 2016).



Durante a congelação há formação de cristais de gelo e maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que pode ocasionar peroxidação lipídica, estresse oxidativo e osmótico e, conseqüentemente, alterações bioquímicas, funcionais e ultraestruturais no espermatozoide (ALLAI *et al.*, 2018). O estresse oxidativo em consequência da formação de EROs reduz o potencial fecundante dos espermatozoides, uma vez que causa danos ao DNA e a membrana espermática. Nos ovinos há maior susceptibilidade dos espermatozoides a estes danos uma vez que sua membrana possui maior taxa de ácidos graxos poli-insaturados/saturados e menor razão molar entre colesterol e fosfolipídios do que é verificado em outras espécies, tornando-o mais susceptíveis as injúrias ocasionadas pela criopreservação, impactando nas taxas de fertilização (EVANS; MAXWELL, 1990).

Sendo assim, diversos estudos vêm mostrando que a adição de substâncias antioxidantes aos diluentes seminais pode trazer benefícios, por sua capacidade de reduzir a formação de EROs (CÂMARA; GUERRA, 2011). Uma possível alternativa, é o uso de extratos vegetais, como o óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm). De acordo com Lages *et al.* (2022), o óleo de pequi possui diversos compostos na sua constituição como vitaminas, lipídeos, carotenoides e compostos fenólicos que são associados ao seu potencial antioxidante. Quando adicionado ao diluente na refrigeração de sêmen suíno e ovino mostrou maior percentual de motilidade espermática quando comparado ao diluente sem o seu uso (COELHO *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2019) demonstrando seu potencial efeito benéfico à criopreservação.

Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição de 5% de óleo de pequi ao diluente à base de água de coco em pó (ACP®) sobre parâmetros espermáticos de sêmen ovino após processo de criopreservação.

Material e métodos

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IFCE (CEUA-IFCE) sob nº 9274111020. O trabalho foi realizado no Departamento de Pesquisa, Extensão e Produção (DPEP) e no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (BIOREP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *campus* Crato (7°12'18.1"S 39°26'52.8"W). Para a experimentação foram utilizados seis reprodutores ovinos da raça Santa Inês, clinicamente sadios e com exame andrológico satisfatório. A colheita do sêmen foi realizada com o uso de vagina artificial e manequim.



De cada animal obteve-se 4 ejaculados ($n= 24$), que foram submetidos a avaliação macroscópica e microscópica (CBRA, 2013) imediatamente após a coleta e então diluídos em água de coco em pó (ACP Biotecnologia®, Fortaleza-Ceará, Brasil) + 15% de gema de ovo + 6% de glicerol acrescido (T1) ou não (T0) de 5% de óleo de pequi (OP), obtendo-se uma concentração final de 200×10^6 espermatozoides/ml. O óleo de pequi foi obtido a partir de produtores locais. As amostras foram então envasadas em palhetas francesas (0,5 ml), posicionadas na rampa de congelamento e submetidas a congelamento de acordo com Cavalcante et al., (2018) modificado.

Para tanto, as palhetas foram refrigeradas utilizando-se geladeira/refrigerador, em uma taxa de refrigeração de aproximadamente $0,2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (entre 2 e 3 h) até atingir a temperatura de 4°C , sendo então mantidas em equilíbrio por, aproximadamente 1 h. Após este período de equilíbrio, as palhetas foram colocadas no interior de caixa térmica e congeladas em vapor de nitrogênio líquido ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) por 15 min., sobre um suporte a 3,0 cm do nível de nitrogênio e, então, imersas em nitrogênio líquido para armazenamento em botijões criogênicos ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$). A descongelação foi realizada após um intervalo mínimo de uma semana de armazenamento, em banho-maria úmido a 37°C por 30 segundos. Em seguida as amostras foram avaliadas quanto à motilidade e ao vigor espermático.

Os dados foram expressos em média e desvio padrão, adotou-se delineamento inteiramente casualizado, ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação das médias, com $P < 0,05$.

Resultados e discussão

O sêmen fresco apresentou cor branca e aspecto leitoso-aquoso, com volume médio de 0,93 ml, concentração de $4029,2 \times 10^6$ espermatozoides/ml, motilidade de 93,33% e vigor de 4,92, estes parâmetros estão de acordo com os valores mínimos recomendados pelo CBRA (2013) para sêmen ovino *in natura*. Após o processo de criopreservação foi verificada a redução significativa ($P < 0,05$) nos parâmetros de motilidade e vigor espermático independente do uso do OP. Ao se comparar os tratamentos, verifica-se que o maior percentual ($P < 0,05$) de motilidade e vigor foi observado ao se adicionar 5% de OP ao diluente (Tabela 1).



Tabela 1 - Motilidade total (%) e vigor do sêmen ovino pós descongelação, utilizando (T1) ou não (T0) 5% de óleo de pequi no diluente à base de água de coco em pó (ACP).

Parâmetros seminais	Tratamentos	
	T0	T1
Motilidade	17,29±14,59 ^b	42,5±16,55 ^a
Vigor	1,375±0,875 ^b	2,625±0,646 ^a

^{ab} - Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05)

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), um ejaculado ovino fresco deve ter 80% ou mais de motilidade total e no mínimo 3 de vigor (escala de 1-5), enquanto o descongelado deve apresentar no mínimo 30% e 3 para os mesmos parâmetros, respectivamente. Sendo assim, os resultados encontrados mostram que o tratamento com a adição de 5% de OP apresentou maiores percentuais de motilidade total, conseguindo garantir mais de 40%, ficando acima do valor mínimo estabelecido pelo CBRA (2013). Por outro lado, o vigor obtido ficou abaixo do desejado, porém, com a adição do OP o valor obtido foi mais próximo ao preconizado pelo CBRA do que o diluente sem a sua adição.

Estes resultados podem estar associados ao caráter antioxidante do OP, reduzindo a formação de radicais livres potencialmente oxidantes, ou seja, diminuição de EROs que causariam injúrias aos espermatozoides. Segundo Câmara e Guerra (2011), a formação desses radicais livres em baixas concentrações é importante para o metabolismo da célula espermática pois intermediam reações de capacitação e a acrossomal, dentre outras funções, mas se houver elevação nas suas quantidades pode ocorrer rearranjo dos ácidos graxos poli-insaturados causado pela peroxidação lipídica, que ocasiona mudanças estruturais e funcionais da membrana celular.

O OP é rico em compostos como os ácidos graxos (mono e poli-insaturados e saturados), carotenos, vitamina E, e retinol, além de ser fonte de vitamina C, compostos fenólicos, como flavonoides, saponinas e óleos essenciais, os quais são componentes com propriedades antioxidantes (LAGES *et al.*, 2022). Além disso, estudos mostram que a motilidade espermática pode ser influenciada positivamente pela adição de ácidos graxos poli-insaturados ao meio, favorecendo a sua fluidez e melhorando a motilidade e a intensidade do movimento (AGUIAR *et al.* 2020), o que pode ter contribuído para os melhores resultados obtidos com o uso do OP.

Conclusão



Conclui-se que a inclusão de 5% de óleo de pequi ao diluente a base de água de coco em pó (ACP), conseguiu não somente garantir a manutenção da motilidade total espermática como trouxe melhores resultados de vigor espermático, quando comparado ao tratamento controle. Mesmo ainda não obtendo valores satisfatórios para motilidade progressiva, a adição do OP se mostrou uma eficiente alternativa para os meios diluidores.

Agradecimento

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM - UERN), Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA – UFERSA), ACP Biotecnologia®, IFCE.

Referências

- AGUIAR, C. S.; BARROS, C. H. S. C.; MACHADO, W. M.; ALLAMAN, I. B.; BARBOSA, L. P.; SNOECK, P. P. N. Efeito do ácido docosa-hexaenoico e do Trolox® no diluidor de refrigeração de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 72, n. 1, p. 71-78, 2020.
- ALLAI, L.; BENMOULA, A.; MARCIANE DA SILVA, M.; NASSER, B.; EL AMIRI, B. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science.**, v. 192, p.6-17, 2018.
- BERGSTEIN-GALAN, T. G.; WEISS, R. R.; BERTOL, M. A. F.; ABREU, A. C. M. R.; WESOLOVSKY, A. Comparação de três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas. **Archives of Veterinary Science**, v.21, n.4, p.66-73, 2016.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.
- CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; AGUIAR, G. V; SALMITO-VANDERLEY, C. S. B.; MOURA, A. A. A.; NUNES, J. F. Perfil proteico do plasma seminal ovino e sua relação com a criopreservação nos diluentes TRIS e Água de Coco em Pó. **Ciênc. Anim.**, v. 28, n. 3, p. 45-55, 2018.
- CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- COELHO, D. F. S. ; RIBEIRO, E. O. M. ; SALES, T. V. G. ; BRITO, E. G. C. B. ; LIMA, G. L. Efeito do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* wittm) sobre a refrigeração de sêmen ovino em meio diluente à base de água de coco em pó. In: XXV PEC Nordeste, 2022, Fortaleza. **Anais do XXV PEC nordeste**, 2022. v. 1. p. 1-1.



EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. 1st ed. Zaragoza: Acribia; 1990. 192p. Spanish.

LAGES, L. P.; MENDES, A. L. R.; COSTA, J. V.; NEVES, G. C. da S.; MELO, S. M. Revisão integrativa do uso do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, e 245111234444, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34444>.

SILVA, J.C.S. et al. Efeito antioxidante do óleo de pequi (*cariocar coriaceum wittm*) sobre a membrana plasmática de espermatozoides refrigerados de suínos. In: 29º CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2019, Uberaba. **Anais [...]** Campinas, Galoá, 2019.



EFEITOS DO USO DE ANTIOXIDANTES NA INTEGRIDADE DE MEMBRANA PÓS-DESCONGELAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES DE *Prochilodus brevis*

EFFECTS OF THE USE OF ANTIOXIDANTS ON POST-THAWING MEMBRANE INTEGRITY OF *Prochilodus brevis* SPERMATOZOA

Kamila Teixeira DE PAULA^{1*}, Thais Maia TORRES², Carla Tatiana Nascimento SOUSA²,
Jessica Sales LOBATO², Yasmim Maia FERREIRA², João Eudes Farias Cavalcante FILHO²,
Ana Vitória Correia SALES¹, Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY²

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de
Peixes, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

*E-mail: kamila.teixeira@aluno.uece.br

Abstract

Seminal cryopreservation appears as an excellent alternative applied to reproductive biotechnology in species such as *Prochilodus brevis*. To reduce cell damage and improve post-thawing sperm quality, antioxidant agents can be added to the dilution solution. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of the use of antioxidants on the post-thawed sperm membrane integrity of *P. brevis*. After hormonal induction, semen from 24 males was collected, stored in pools, supplemented with three antioxidants at four different concentrations (Taurine – 0,3; 1; 3,16 or 10 mM, Cysteine – 0,3; 1; 3,16 or 10 mM or Melatonin – 0,6; 1,12; 2 or 3,56 mM) and submitted to the cryopreservation process. After thawing, the samples were evaluated under an optical microscope (400x) for membrane integrity. Statistical differences were observed between the control and all treatments containing Melatonin (0,6; 1,12; 2 or 3,56 mM) and 10 mM cysteine, with the control being inferior to these treatments. Therefore, supplementation of *Prochilodus brevis* seminal freezing medium with 1,12 mM Melatonin is indicated.

Keywords: freezing, fish, semen, supplementation.

Introdução

Prochilodus brevis é um peixe teleósteo e reofílico nativo do semiárido brasileiro e que ocupa toda a região Nordeste do Brasil (CHELLAPA *et al.*, 2009). A construção de barragens nos rios e a escassez de chuvas são fatores que impedem a realização da piracema, dificultando sua reprodução e ameaçando sua preservação na natureza (NASCIMENTO *et al.*, 2012).

A criação dessa espécie em cativeiro, para fins comerciais ou programas de conservação, aliado a criopreservação seminal, surge como uma excelente alternativa (SHIMODA, 2004). Logo, a fim de reduzir os danos causados às células e melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento, agentes antioxidantes podem ser adicionados à solução diluidora que é composta



por glicose 5%, dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e gema de ovo 5% (TORRES *et al.*, 2022). Os antioxidantes, quando utilizados na congelamento seminal, protegem a célula contra o estresse oxidativo, que é causado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou por sua lenta remoção devido a baixa quantidade de substâncias antioxidantes (LOPES *et al.*, 2016).

A taurina é um aminoácido sulfurado essencial e possui sua ação antioxidante comprovada, estando essa ação provavelmente associada à desintoxicação do ácido hipocloroso (ARUOAMA *et al.*, 1988). Esse antioxidante já foi usado na congelamento espermática de peixes apresentando bons resultados, entretanto, a ação dos antioxidantes é espécie-específica e depende do tipo de molécula e da concentração utilizada (LIU *et al.*, 2015).

A cisteína também é um aminoácido sulfurado, tendo sua ação antioxidante baseada na sua capacidade de eliminar os radicais livres através de uma interação química direta com eles (BILODEAU *et al.*, 2001).

O hormônio melatonina se destaca por agir na membrana celular e na mitocôndria, agindo como um *scavenger* de radicais livres (REITER *et al.*, 2013; CRUZ *et al.*, 2014). Estudos recentes mostraram que a melatonina pode agir como antioxidante quando adicionada ao sêmen de peixe para o processo de criopreservação espermática, reduzindo assim, danos aos espermatozoides (MOTTA *et al.*, 2022; PALHARES *et al.*, 2020, 2021).

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da utilização de antioxidantes na integridade de membrana espermática pós-descongelamento de *P. brevis*

Material e Métodos

Foram utilizados 24 machos de *P. brevis*, pertencentes ao plantel do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes (LBRP), que foram induzidos à espermição utilizando uma concentração de 0,5 ml de ovopel por quilo de peso vivo, aplicadas em dose única. Após sedação com eugenol, o sêmen foi coletado em seringas estéreis de 3 mL, por meio de massagem abdominal, com o devido cuidado para evitar contaminação por água, fezes ou urina. As amostras foram avaliadas quanto à motilidade espermática, sendo descartadas aquelas com taxas inferiores a 90%. Foram formados sete *pools* (3 animais por pool) para a congelamento.

Os *pools* de sêmen foram diluídos, na proporção de 1:9 (sêmen: diluidor), em meio contendo Glicose 5%, DMSO 10% e gema de ovo 5%. O meio foi suplementado com três antioxidantes em quatro diferentes concentrações (Taurina – 0,3; 1; 3,16 ou 10 mM ou Cisteína – 0,3; 1; 3,16 ou 10



mM ou Melatonina – 0,6; 1,12; 2 ou 3,56 mM), totalizando doze tratamentos e o controle (sem adição de antioxidantes). As amostras foram, então, submetidas ao processo de criopreservação, o qual consistiu no envasamento do sêmen em palhetas, permanência em refrigeração (~ 10 °C) por 10 minutos, permanência em *dry shipper* por 15 minutos e posteriormente a imersão em nitrogênio líquido, onde permaneceu por 15 dias. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 30 °C por 16 segundos e analisadas quanto a integridade de membrana.

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática dos espermatozoides, o método de coloração eosina-nigrosina foi utilizado (Blom, 1950). Para isso, foi feita uma mistura de 5 µL de sêmen com 10 µL de eosina e 10 µL de nigrosina (proporção 1:2:2 - sêmen:eosina:nigrosina) e, com ela, foi realizado um esfregaço. Uma lâmina por amostra foi avaliada, utilizando microscópio de luz (400x), em que 200 espermatozoides foram analisados. Os espermatozoides incolores foram considerados com a membrana íntegra, enquanto os corados em rosa ou vermelho, com a membrana rompida.

Os dados foram submetidos a Análise de Variância (One-way ANOVA) seguido do teste de Shapiro-Wilk para normalidade, teste de Levene e Fligner-Kileen para homogeneidade e, posteriormente, teste de Duncan para comparação entre os tratamentos e o controle. Todos os dados foram expressos em média ± erro padrão.

Resultados e Discussão

Foram observadas diferenças estatísticas entre o controle e todos os tratamentos contendo Melatonina (0,6; 1,12; 2 ou 3,56 mM) e cisteína 10 mM, sendo o controle inferior a esses tratamentos (Tabela 1). Os demais tratamentos não apresentaram diferença em relação ao controle. Quando comparados os tratamentos entre si, todos os que continham Melatonina e Cisteína e os que continham Taurina 3,16 mM e 10 mM foram semelhantes, não apresentando diferença estatística (Tabela 1). Os tratamentos contendo Taurina 0,3 mM e 1 mM foram inferiores aos que continham Melatonina 1,12 mM e 3,56 mM, entretanto não apresentaram diferença em relação aos demais (Tabela 1).



Tabela 1 - Efeitos da utilização de crioprotetores externos e antioxidantes sobre a integridade de membrana de *Prochilodus brevis*

	Integridade de membrana (%)
Controle	63,58 ± 8,27 ^c
Cisteína 0,3	71,42 ± 3,63 ^{abc}
Cisteína 1	78,21 ± 2,68 ^{abc}
Cisteína 10	80,85 ± 3,23 ^{ab}
Cisteína 3,16	75,42 ± 4,50 ^{abc}
Melatonina 0,6	81,42 ± 4,58 ^{ab}
Melatonina 1,12	84,92 ± 2,63 ^a
Melatonina 2	81,85 ± 3,35 ^{ab}
Melatonina 3,56	83,21 ± 2,97 ^a
Taurina 0,3	68,14 ± 7,22 ^{bc}
Taurina 1	68,64 ± 5,49 ^{bc}
Taurina 10	73,35 ± 3,81 ^{abc}
Taurina 3,16	77,28 ± 2,73 ^{abc}

a-c: Valores com letras diferentes são expressos sendo $P < 0,05$. Os dados são apresentados como média e erro padrão (\pm EP).

Conclusão

Dessa forma, com o objetivo de melhorar a qualidade referente a integridade de membrana espermática pós-descongelamento, indica-se a suplementação do meio de congelamento seminal de *Prochilodus brevis* com Melatonina 1,12 mM. Sugere-se realizar outras análises espermáticas utilizando esses tratamentos.

Referências

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; HOEY, B. M.; BUTLER, J. The antioxidant action of taurine, hypotaurine and their metabolic precursors. **Biochemical Journal**, v. 256, p. 251- 255, 1988.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M. A. Thiols prevent H₂O₂- mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-286, 2001.



CHELLAPPA S., BUENO R.M.X., CHELLAPPA T., CHELLAPPA N.T. & VAL V.M.F.A. Reproductive seasonality of the fish fauna and limnoecology of semi-arid Brazilian reservoirs. **Limnologica**. 39(4): 325-329, 2009.

CRUZ, M. H. C.; LEAL, C. L. V.; CRUZ, J. F.; TAN, D.; REITER, R. J. Role of melatonin on production and preservation of gametes and embryos: A brief review. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 150-160, 2014.

LIU, Q.; WANG, X.; WANG, W.; ZHANG, X.; XU, S.; MA, D.; XIAO, Z.; XIAO, Y.; LI, J. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. **Fish PhysiolBiochem**, v. 41, p. 413-422, 2015.

LOPES, J.T.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; ALMEIDA-MONTEIRO, P.S. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelamento seminal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.1, p.29-34, 2016.

MOTTA, C. N.; EGGER, R. C.; MONTEIRO, K. S.; OLIVEIRA, A. V.; MURGAS, L. D. S. Effects of melatonin supplementation on the quality of cryopreserved sperm in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Theriogenology**, v. 179, p. 14-21, 2022.

NASCIMENTO, M.M.; NASCIMENTO, W.S.; CHELLAPA, N.T.; CHELLAPA, S. Biologia reprodutiva do curimatã comum, *Prochilodus brevis* (Characiformes: Prochilodontidae) no açude Marechal Dutra, Rio Grande do Norte, Brasil. **Biota Amazônica**, v. 2, n. 2, p. 31-43, 2012.

PALHARES, P. C.; ASSIS, I. L.; SOUZA, J. G. S.; FRANÇA, T. S.; EGGER, R. C.; PAULA, D. A. J.; MURGAS, L. D. S. Effect of melatonin supplementation to a cytoprotective medium on post-thawed *Brycon orbignyanus* sperm quality preserved during different freezing times. **Cryobiology**, v 96, p. 159-165, 2020.

PALHARES, P. C.; ASSIS, I. L.; MACHADO, G. J.; DE FREITAS, R. M. P.; DE FREITAS, M. B. D.; PAULA, D. A. J.; CARNEIRO, W. F.; MOTTA, N. C.; MURGAS, L. D. S. Sperm characteristics, peroxidation lipid and antioxidant enzyme activity changes in milt of *Brycon orbignyanus* cryopreserved with melatonin in different freezing curves. **Theriogenology**, v. 176, p. 18-25, 2021

REITER, R. J.; ROSALES-CORRAL, S. A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. Peripheral Reproductive Organ Health and Melatonin: Ready for Prime Time. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14(4), p. 7231-7272, 2013.

SHIMODA, E. **Análise e criopreservação do sêmen da piabanha *Brycon insignis*** Steindachner, 1877 (Pisces, Characidae). 2004. 121 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R J. Brasil. 2004.

TORRES T.M; ALMEIDA-MONTEIRO P.S.; NASCIMENTO R.V.; PEREIRA V.A.; FERREIRA Y.M.; LOBATO J.S.; PINHEIRO R.R.R.; SALES Y.S.; MONTENEGRO A.R.; SALMITO-VANDERLEY C.S.B. Sperm cryopreservation of *Prochilodus brevis* using different concentrations of non permeable cryoprotectants. **Anim Reprod**.19(1):e20210083, 2022.



EFEITO DOS DILUENTES SOBRE OS ASPECTOS CINÉTICOS DO SÊMEN REFRIGERADO DE CATETOS (*Pecari tajacu*) ARMAZENADOS A 17 °C

EFFECT OF DILUENTS ON THE KINETIC ASPECTS OF CHILLING SEMEN OF PECCARY (*Pecari tajacu*) STORED AT 17 °C

Gabriel Santos Costa BEZERRA^{1*}; Romário Parente dos SANTOS¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Yasmin Carla da Silva CAVALCANTE¹; Ana Gloria PEREIRA¹; Tainá Moura MATOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal - LCGA, Departamento de Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil;

*e-mail: gabrielsbezerra@gmail.com

Abstract

The aim was to analyze the effect of commercial extenders on the kinetic aspects of collared peccary semen under chilling. Semen samples of six adult males were collected by electroejaculation. Samples were aliquoted and diluted in Tris-egg yolk (20%) as the control, or in the commercial extenders: PRIMXcell Ultra and BTS. Samples were refrigerated and stored for up to 48h at 17 °C, and evaluated by kinetic motion parameters using a computer aided sperm analyzer. Significant differences were found for total and progressive motility and kinetic aspects of the semen, mainly at 24 and 48 hours intervals ($P < 0.05$). The most effective results were obtained for the TRIS extender, which was able to guarantee the maintenance of the kinetic aspects of the samples, as well as the best values for total motility (58.0 ± 10.0) at 48h and progressive motility (36.2 ± 6.41) at 24h. The commercial extenders PRIMXcell ultra and the BTS were not efficient to maintain the aspects studied, but the TRIS extender is a promising dilution medium for cooling collared peccary semen for up to 48 h.

Keywords: wildlife, biobank, semen chilling, short-term storage.

Introdução

O uso de sêmen refrigerado em animais domésticos amplia-se a cada dia, entretanto, é necessário o aprimoramento dos protocolos de refrigeração, buscando validar e viabilizar a utilização em larga escala dessa biotécnica em espécimes silvestres (SILVA *et al.*, 2019). Nesse sentido, a utilização de sêmen refrigerado para a conservação das células espermáticas em catetos é bastante incipiente. Tal técnica já foi testada para a espécie, entretanto só foi possível preservar as amostras de sêmen por um intervalo de tempo de 36 horas após diluição em Tris acrescido de gema de ovo ($45,5 \pm 9,0$) ou Aloe vera ($40,2 \pm 17,2$) a 20% (SOUZA *et al.*, 2016).

É importante salientar, que a adequação da temperatura durante processo de refrigeração e no seu armazenamento são fundamentais para a manutenção da qualidade espermática final (logo após o aquecimento) (KHAN *et al.*, 2021). Além disso, os protocolos de refrigeração adequados,



utilizam meios de diluição que são fundamentais para garantir o sucesso na conservação do sêmen, pois essas substâncias são destinadas para garantir a sobrevivência das células espermáticas em condições adversas durante o processo de refrigeração (SILVA; GUERRA, 2011).

Neste contexto, objetivou-se analisar a influência dos diluentes comerciais (PRIMXcell Ultra® e Beltsville Thawing Solution®) sobre os aspectos cinéticos dos espermatozoides de catetos submetidos a refrigeração por até 48 horas.

Material e métodos

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFERSA (Parecer nº 12/2022). Ejaculados de seis machos adultos, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil), foram obtidos por eletroejaculação sob anestesia com propofol (5 mg/Kg IV) em bolus (CASTELO *et al.*, 2010). Foram avaliados os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e os aspectos cinéticos dos espermatozoides por meio de sistema de análise computadorizada (CASA - IVOS 7.4G; Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA), mediante as configurações previamente estabelecidas para a espécie por Souza *et al.* (2016).

O sêmen de cada animal coletado, foi dividido igualmente em quatro alíquotas, referente ao número de diluentes utilizados nesse momento (Tris + gema de ovo (20%); PRIMXcell Ultra® (PRIMX) e Beltsville Thawing Solution® (BTS) - IMV Technologies, Normandia, França). Todos os diluentes foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, sendo preconizada a concentração final de 100×10^6 de espermatozoides / mL, durante a diluição. As frações diluídas nos respectivos extensores mencionados foram acondicionadas em incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD, Quimis, São Paulo, Brasil) a 17 °C, seguindo as recomendações de Souza *et al.* (2016). Foram procedidas avaliações dos parâmetros cinéticos espermáticos após 24 e 48 h de armazenamento.

Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média. Os dados foram primeiro avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade da amostra, e transformados utilizando função aritmética de $\log(x + 1)$ ou arco-seno ($\sqrt{x/100}$) quando necessário. O efeito do tempo de armazenamento (0, 24 e 48 horas) durante a refrigeração sobre os parâmetros cinéticos foi avaliado por ANOVA para medidas repetidas, utilizando modelo linear geral e procedimento GLM REP, seguida do Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. Todas as análises foram realizadas



usando o IBM SPSS Statistics (Versão 21.0. Armonk, NY: IBM Corp), com nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

Resultados e discussão

Os ejaculados frescos apresentaram aspecto aquoso, cor branca, e um volume de $1,2 \pm 0,3$ mL com concentração de $486,2 \pm 112,3 \times 10^6$ espermatozoides/mL, e valores médios de $89,7 \pm 3,1\%$ de motilidade total, $67,5 \pm 7,4$ de progressiva, $75,3 \pm 3,2\%$ de viabilidade, $75,3 \pm 3,2$ de atividade mitocondrial e resposta osmótica de $92,6 \pm 2,5\%$. No sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, foram encontradas diferenças estatísticas entre as amostras diluídas em Tris + gema de ovo e os diluentes comerciais (PRIMXcell Ultra e BTS) para motilidade progressiva e motilidade total, respectivamente (Figura. 1, $P < 0,05$), mas os diluentes comerciais não diferiram entre si. Foi verificada uma redução linear significativa na preservação dos aspectos supracitados durante o experimento para os tratamentos utilizados ($P < 0,05$), com exceção do Tris. Nesse contexto, o PRIMX e o BTS, não foram eficientes na manutenção dos aspectos de motilidade total e progressiva.

Constatou-se diferença significativa quanto aos parâmetros cinéticos em relação ao tipo de diluente utilizado, assim como nos intervalos de tempo avaliado (Tabela. 1, $P < 0,05$). No intervalo de 24h os diluentes comerciais apresentaram valores reduzidos em comparação ao TRIS, para os parâmetros de VAP, VSL e VCL para o PRIMX e BTS, e ALH somente para o BTS. Às 48h, foram perceptíveis as diferenças para os mesmos aspectos mencionados anteriormente apenas para o tratamento BTS em comparação com o tratamento controle. A manutenção desses parâmetros é extremamente importante pois está correlacionada diretamente com a taxa de fertilização dos oócitos (VERSTEGEN *et al.*, 2002).



Figura 1 - Valores (médios \pm erro padrão da média) para motilidade total e progressiva em sêmen refrigerado de catetos (*Pecari tajacu*) (n = 6) diluído em Tris + gema de ovo (20%), PRIMXcell Ultra e BTS, armazenados por até 48h a 17 °C. Letras minúsculas (^A) denotam que existe diferença significativa entre os tratamentos dentro do intervalo de tempo avaliado. Letras maiúsculas (^{A, B}) indicam diferenças significativas para os tratamentos PRIMXcell Ultra e BTS ao longo do tempo. Significância de 5% (P < 0,05).

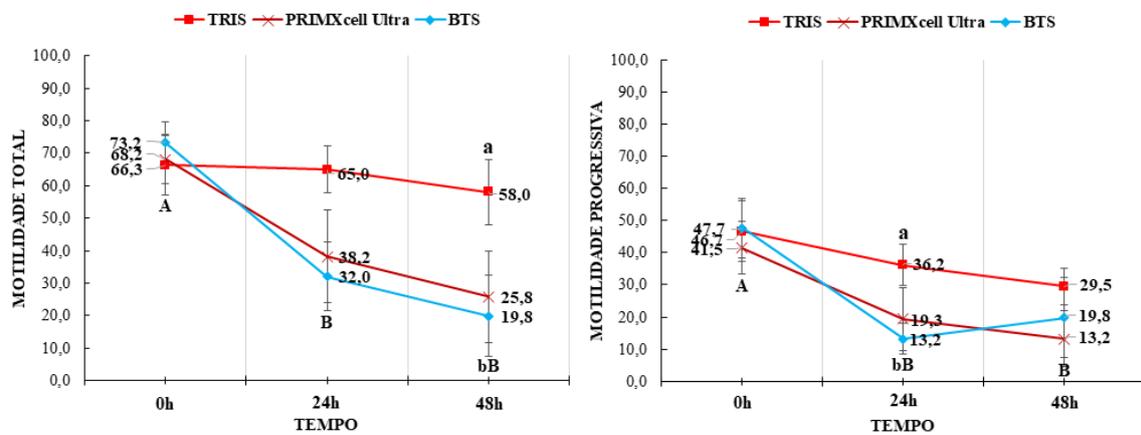


Tabela 1 - Valores (média \pm erro padrão da média) para parâmetros cinemáticos em sêmen refrigerado de catetos (*Pecari tajacu*) diluído em Tris mais gema de ovo, PRIMXcell Ultra e BTS, armazenados até 48 h a 5 °C (n = 6).*

PC	0h			24h			48h		
	TRIS	PRIMX	BTS	TRIS	PRIMX	BTS	TRIS	PRIMX	BTS
VAP	62,6 \pm 6,5	49,0 \pm 4,8 ^a	48,6 \pm 5,5 ^a	59,5 \pm 6,5 ^a	35,2 \pm 5,0 ^{ab}	36,1 \pm 3,4 ^{ab}	60,5 \pm 2,0 ^a	32,6 \pm 12,3 ^{ab}	26,2 \pm 9,9 ^{ab}
VSL	48,2 \pm 8,0	35,3 \pm 4,3	37,1 \pm 4,9 ^a	35,9 \pm 4,7 ^a	22,7 \pm 3,4 ^a	22,9 \pm 2,6 ^{ab}	35,9 \pm 4,7 ^a	20,9 \pm 7,9 ^a	17,2 \pm 6,3 ^{ab}
VCL	122,4 \pm 6,2	101,6 \pm 9,2	101,4 \pm 9,6 ^a	135,2 \pm 12,7 ^a	84,7 \pm 12,5 ^b	95,8 \pm 7,0 ^{ab}	137,2 \pm 5,4	77,8 \pm 28,3 ^{ab}	62,9 \pm 23,8 ^{ab}
ALH	6,4 \pm 0,2	5,7 \pm 0,5	5,5 \pm 0,5 ^a	7,3 \pm 0,5 ^a	6,7 \pm 0,4 ^{ab}	5,8 \pm 0,3 ^{ab}	7,6 \pm 0,2 ^a	4,7 \pm 1,5 ^{ab}	3,3 \pm 1,2 ^{ab}
BCF	34,9 \pm 1,1	36,2 \pm 0,9	37,4 \pm 0,9 ^a	32,4 \pm 0,7	36,1 \pm 2,0	34,1 \pm 4,1 ^a	31,1 \pm 2,4	25,0 \pm 7,9	19,6 \pm 7,5 ^b
STR	72,0 \pm 3,7 ^a	69,8 \pm 3,8 ^a	72,7 \pm 3,8 ^a	57,7 \pm 1,8 ^{ab}	62,3 \pm 1,8 ^a	60,8 \pm 0,9 ^b	55,8 \pm 1,6 ^b	40,2 \pm 12,7 ^b	42,3 \pm 13,6 ^b
LIN	38,5 \pm 4,1	36,5 \pm 4,7	37,2 \pm 4,2 ^a	31,7 \pm 5,1	28,8 \pm 0,9	25,5 \pm 1,4 ^a	1,8 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1 ^b

*VAP - Velocidade média da trajetória ($\mu\text{m/s}$), VSL - Velocidade linear progressiva ($\mu\text{m/s}$), VCL = Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$), ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm), BCF - Frequência de batimento flagelar cruzado (Hz), STR – Índice de progressão (%), LIN – Índice de Linearidade (%). Letras minúsculas (^{a, b}) em sobrescrito nas linhas de cada intervalo, indicam que existe diferença significativa para os diferentes tratamentos (diluentes). Letras maiúsculas (^{A, B}) nas colunas, indicam diferença significativa para as medidas dos tratamentos nos intervalos de tempo (0, 24, 48h) (P < 0,05).

Para a comparação das medidas de cada tratamento ao longo do tempo foram verificados que os aspectos cinéticos para o tratamento TRIS se comportaram de forma igualitária até as 48h, garantido a manutenção desses parâmetros ao longo do tempo, com exceção do STR que sofreu redução linear a partir das 24h. Ao verificar a atuação do PRIMX durante os intervalos analisados,



o mesmo apresentou-se eficiente na manutenção de todos os parâmetros cinéticos, com exceção do VAP e STR. Por fim, o BTS foi o único que teve redução linear acentuada para todos os aspectos cinéticos durante o intervalo de 48h, possibilitando apenas a conservação dos parâmetros de VAP, BCF e LIN até 24h. Amostras com índices elevados relacionados a esses parâmetros de velocidade e de LIN e BCF demonstram melhor migração e penetração no muco cervical das fêmeas (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Conclusão

Os diluentes comerciais PRIMXcell Ultra e o BTS não foram eficientes para garantir a manutenção da motilidade total, progressiva e nos parâmetros cinéticos do sêmen de catetos submetidos a refrigeração em sistema BOD armazenados a 17 °C. Porém, o diluente TRIS, apresenta-se como meio de diluição promissor para refrigeração de sêmen de catetos até 48 h.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris based extenders. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p.1060-1065, 2010.
- KHAN, I. M.; CAO, Z.; LIU, H.; KHAN, A.; RAHMAN, S. U.; KHAN, M. Z.; SATHANAWONGS, A.; ZHANG, Y. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, 2021.
- MORTIMER, S. T. Casa - Practical aspects. **Journal of Andrology**, v. 21, n.4, p.515-524, 2000.
- SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; SILVA, R. G.; NOGUEIRA, E.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; NICACIO, A. C.; RODRIGUES, W. B. Uso de sêmen refrigerado bovino: quebrando paradigmas. *In*: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 23., 2019, Gramado, 2019. **Anais[...]** Gramado: Revista Brasileira de Reprodução animal, 2019. p.284-288.
- SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n. 4, p.370-384, 2011.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.) Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, v.85, n.8, p.1432-1438, 2016.

VERSTEGE, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.



ESTIMATIVA DA FASE DO CICLO ESTRAL POR CITOLOGIA VAGINAL EM ÉGUAS (*Equus Caballus*), ATENDIDAS NO HVU/CPCE EM BOM JESUS-PI

ESTIMATION OF THE PHASE OF THE ESTRAL CYCLE BY VAGINAL CYTOLOGY IN MARES (*Equus caballus*), MET AT HVU/CPCE IN BOM JESUS-PI

Vilian de Souza MATOS^{1*}; João Victor Souza SILVA²; Gabriela Assis da Silva BARBOSA¹;
Maria Thamires Pereira de ARAÚJO¹; Rafael Alves Ferreira ARAÚJO¹; Landara Lidia Santana de
CARVALHO¹; Antônio Francisco da Silva LISBOA NETO³; Manoel Lopes da SILVA FILHO⁴

¹Discente do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Campus Professora
Cinobelina Elvas, Bom Jesus, Piauí, Brasil.

²Graduado em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas,
Bom Jesus, Piauí, Brasil.

³Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, Campus
Professora Cinobelina Elvas em Bom Jesus, Piauí, Brasil.

⁴Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí,
Campus Professora Cinobelina Elvas em Bom Jesus, Piauí, Brasil.

*villianmattos@ufpi.edu.br

Resumo

Objetivou-se avaliar a fase reprodutiva de éguas da região de Bom Jesus-PI através da citologia vaginal. Foram utilizadas dezessete éguas atendidas na rotina do Hospital Veterinário Universitário-HVU/CPCE/Bom Jesus-PI, sendo feita paralelamente, preenchimento da ficha de avaliação para obtenção de dados dos animais quanto à idade, número de partos, acasalamentos e uso destes com finalidade reprodutiva. O ciclo estral da égua se divide em fases sucessivas e individualizadas, caracterizadas em fases folicular e lútea, sendo elas: proestro, estro, metaestro e diestro, seguido de anestro. Estas fases podem ser diferenciadas por exames hormonais ou citológicos, classificando os diversos tipos de células do epitélio vaginal, o que permite estimar o período de fertilidade, distúrbios do ciclo estral e inatividade sexual. Desta forma, o presente trabalho teve o intuito de realizar exames citológicos vaginais em éguas e identificar sua fase reprodutiva. Para tanto, foram realizados exames em 18 fêmeas atendidas na rotina do HVU/CPCE, na cidade de Bom Jesus-PI, sendo encontrados 11,11% destes animais em proestro e metaestro; 22,22% em estro e anestro; 33,33% em diestro. Portanto, a citologia vaginal é extremamente praticável visto que é realizado de maneira simples, rápido e com baixo custo, auxiliando, assim, no manejo reprodutivo na espécie.

Palavras-chave: Égua, Exames citológicos, Fase reprodutiva.

Abstract

The objective was to evaluate the reproductive phase of mares in the region of Bom Jesus-PI through vaginal cytology. We used seventeen mares treated in the routine of the University Veterinary Hospital-UVH/CPCE/Bom Jesus-PI, being made in parallel, filling in the evaluation form to obtain data from the animals regarding age, number of parturitions, matings and use of these for reproductive. The estrus cycle of the mare is divided into successive and individualized phases, characterized in follicular and luteal phases, namely: proestrus, estrus, metestrus and diestrus, followed by anestrus. These phases can be differentiated by hormonal or cytological exams, classifying the different types of cells of the vaginal epithelium, which allows estimating the



period of fertility, disturbances of the estrous cycle and sexual inactivity. Thus, the present work aimed to perform vaginal cytological exams in mares and identify their reproductive phase. For that, exams were carried out in 18 females attended in the routine of the HVU/CPCE, in the city of Bom Jesus-PI, being found 11.11% of these animals in proestrus and metestrus; 22.22% in estrus and anestrus; 33.33% in diestrus. Therefore, vaginal cytology is extremely feasible since it is performed in a simple, fast and low-cost manner, thus helping in the reproductive management of the species.

Keywords: Mare, Cytological exams, Reproductive phase.

Introdução

A detecção do estro é essencial para um manejo reprodutivo eficiente nas espécies domésticas. Na espécie equina não é diferente, no proestro por exemplo, a fêmea equina apresenta sinais externos que sinalizam a aproximação do estro. Esses sinais são alterações do aspecto vulvar que se manifestam como edemaciação e coloração avermelhada. A fêmea em proestro atrai o macho, mas não aceita a monta. A receptividade ao macho com aceitação da monta só acontece no estro, sendo identificado comportamentalmente (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Ainda durante o estro, a vulva tende a aumentar de volume e ficar edemaciada; os lábios vulvares por sua vez, ficam frouxos e se abrem facilmente para o exame. A vulva se apresenta com aspecto avermelhada ou alaranjada, úmida e brilhante, coberta por uma fina camada de muco transparente. A mucosa vaginal é altamente vascularizada e um muco aquoso pode se acumular na vagina. A égua assume a posição característica da micção. A cauda fica levantada, a urina é expelida em pequenas quantidades e o clitóris é exposto através de contrações rítmicas e prolongadas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Nas diversas espécies domésticas, o monitoramento da função ovariana pode ser usado para estimar o período ideal para a monta ou inseminação artificial, mesmo quando sinais externos não são claramente observados. Em éguas, o monitoramento da atividade ovariana pode ser feito por dosagem de progesterona sérica, ultrassonografia dos ovários e citologia vaginal (FELICIANO *et al.*, 2014). A mensuração das concentrações séricas de progesterona pode ser considerada um método confiável para a identificação do momento ideal para a inseminação natural ou artificial, pois contribui para a determinação da fase do ciclo estral em que a égua se encontra (FERRAZ, 2001). Entretanto, este método se torna oneroso ao proprietário, além da necessidade de um laboratório para a realização do exame.

A ultrassonografia, por sua vez, permite a visualização das estruturas ovarianas, e o monitoramento longitudinal do desenvolvimento folicular, possibilitando a previsão aproximada



do momento da ovulação (MAIA, 2011). O custo do equipamento ultrassonográfico, no entanto, é a principal limitação desse método. Por outro lado, a citologia vaginal requer apenas materiais de consumo bastante acessíveis e um microscópio simples.

Portanto, o presente trabalho aborda o ciclo estral da espécie equina e teve por objetivo avaliar a fase reprodutiva de éguas da região de Bom Jesus-PI através da citologia vaginal.

Material e métodos

O material foi coletado durante o atendimento de rotina das éguas no Hospital Veterinário Universitário de Bom Jesus – HVU/BJ e analisado no Laboratório de Reprodução Animal do Campus Professora Cinobelina Elvas, da Universidade Federal do Piauí, no período que compreende março a junho de 2019, sendo feita utilização de tronco para a contenção dos animais no momento da coleta.

Foram avaliadas dezoito éguas da raça quarto de milha, com idades variando de seis a quinze anos, atendidas no HVU/BJ, sendo feita paralelamente, preenchimento da ficha de avaliação para obtenção de dados dos animais quanto à idade, número de partos, acasalamentos e uso destes com finalidade reprodutiva. Cada fêmea foi contida e submetida à limpeza da região vaginal com solução fisiológica, seguida da realização da citologia com auxílio de swab introduzido em ângulos, inicialmente, de 45° e depois 180° para que se obtivesse material da região mais cranial da vagina, sendo este material fixado em lâminas devidamente identificadas e numeradas. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido.

Após a coloração e secagem, cada lâmina foi submetida à microscopia óptica com aumento de 10x, sendo avaliada a porcentagem de células, parabasais, intermediárias e superficiais. A partir deste valor, cada fêmea foi classificada. Os dados obtidos na anamnese, foram então associados a porcentagem de células encontradas na citologia vaginal de cada égua e, a partir daí as fêmeas foram classificadas conforme a fase do ciclo estral: em proestro, estro, metaestro, diestro e anestro. Após determinação da fase do ciclo estral para cada animal, foi calculado a porcentagem em cada fase do ciclo.



Resultados e discussão

Tabela 1- Número de éguas distribuídas por fase do ciclo estral, submetidas à citologia vaginal durante atendimento no HVU-BJ, 2019.

Fase Reprodutiva	Predominância celular	Número de animais	Porcentagem de animais (%)
Proestro	Intermediária	2	11,11
Estro	Superficial	4	22,22
Metaestro	Intermediária	2	11,11
Diestro	Parabasal	6	33,33
Anestro	Parabasal	4	22,22

Das fêmeas avaliadas, dez apresentaram predominância de células parabasais; quatro, predominância de células intermediárias e, em outras quatro éguas, houve predominância de células superficiais. Os resultados obtidos incluíram 33,33% de fêmeas em diestro; 22,22% de fêmeas em estro; 22,22% de fêmeas em anestro; 11,11% de fêmeas em metaestro e 11,11% de fêmeas em proestro (Tabela 1).

Segundo Moraes (2009), fêmeas com predominância de células parabasais podem encontrar-se em fase proestro, diestro ou anestro. A predominância de células intermediárias pode indicar fase de proestro ou metaestro e células superficiais confirmam a fase estral em período próximo à ovulação. Assim, como a predominância de mais de um tipo celular pode indicar mais de uma fase do ciclo estral, torna-se importante a realização da anamnese, com intuito de se obter o histórico reprodutivo.

Portanto, neste estudo, a maioria das éguas encontravam-se na fase de diestro, sendo assim predominando a fase luteínica e não sendo estabelecido relação de sazonalidade na manifestação dos ciclos estrais para a espécie equina no Nordeste brasileiro, mas precisamente na região do sul do estado do Piauí. Para tanto, novos estudos em outras épocas do ano podem ser realizados.

Conclusão

A citologia vaginal é um exame extremamente praticável visto que é realizado de maneira simples, rápido e com baixo custo, auxiliando, assim, no manejo reprodutivo na espécie. No entanto, o histórico obtido através da anamnese torna os resultados mais fidedignos.



Referências

FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R. **Ultrassonografia na reprodução animal**. São Paulo: MedVet, 2014.

FERRAZ, L. E. S. et al. **Concentração de progesterona e de estradiol 17-beta e características ultra-sonográficas da vesícula embrionária no início da gestação em éguas Puro Sangue Inglês**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 53, n. 4, p.1-7, 2001.

HAFEZ, B; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. Barueri, São Paulo, Manole, Sétima Edição, 2004, pg.513.

MAIA, K. M. **Fisiologia e controle do ciclo estral em fêmeas de cateto (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, mantidas em cativeiro no semi-árido brasileiro**. Mossoró, 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró.

MORAES, I. A. **Reprodução nas fêmeas**. 23. fevereiro 2009. Disponível em: http://www.uff.br/fisiovet/Conteudos/reproducao_femeas.htm. Acesso em 09 de junho de 2019.



FERTILIDADE DE FÊMEAS BOVINAS QUE EXPRESSARAM OU NÃO O ESTRO EM UM PROGRAMA DE SINCRONIZAÇÃO PARA IATF

FERTILITY OF BOVINE FEMALES THAT EXPRESSED OR NOT ESTRUS IN A SYNCHRONIZATION PROGRAM FOR FTAI

Maria Antônia Moreira MACIEL^{1*}; Raquel Gomes do AMARAL¹; Artur Azevedo MENEZES²; Marcus Vinícius Galvão LOIOLA²; Rodrigo Freitas BITTENCOURT²; Antonio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹.

¹Centro Multidisciplinar do *Campus* da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil;

²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ), Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

*E-mail: maria.m8290@ufob.edu.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do estro sobre os índices de fertilidade de fêmeas Nelore submetidas a um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizados dados de 65 fêmeas Nelore lactantes, pluríparas, com escore de condição corporal (ECC) de 3. Os animais foram submetidos a um protocolo de IATF e, previamente a IA, todas as vacas foram caracterizadas em dois grupos experimentais de acordo com a expressão do estro verificada pela remoção da tinta do bastão marcador: grupo com expressão do estro (C/ESTRO) e grupo sem expressão do estro (S/ESTRO). O diagnóstico de gestação foi feito por ultrassonografia transretal no dia 45 (D45). As fêmeas do grupo C/ESTRO obtiveram taxa de concepção de 60,5%, significativamente superior àquela apresentada pelos animais do grupo S/ESTRO, que foi 29,6%. Em conclusão, a expressão do estro foi associada a um incremento nos índices de fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF.

Palavras-chave: Concepção, Diagnóstico de gestação, Nelore, Pluríparas.

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the influence of estrus on fertility rates of Nelore females submitted to the fixed-time artificial insemination (FTAI) protocol. Data from 65 lactating and pluriparous Nelore females with a body condition score (BCS) of 3 were used. The estrus was verified by removing the ink from the marker stick: group with estrus expression (C/ESTRO) and group without estrus expression (S/ESTRO). Pregnancy diagnosis was made by transrectal ultrasound on day 45 (D45). The females of the C/ESTRO group had a conception rate of 60.5%, significantly higher than that presented by the animals of the S/ESTRO group, which was 29.6%. In conclusion, estrus expression was associated with an increase in fertility rates of bovine females in FTAI programs.

Keywords: Conception, Diagnosis of pregnancy, Nelore, Pluriparous.



Introdução

Dentre as biotecnologias adotadas na reprodução, a inseminação artificial (IA) está amplamente distribuída no mundo devido à capacidade de garantir melhoramento genético e eficiência reprodutiva. No entanto, em rebanhos *Bos indicus*, a técnica não se mostra eficaz na identificação do estro, devido estes rebanhos apresentarem alto índice de anestro pós-parto, além de estro de curta duração e elevada incidência noturna (SÁ FILHO *et al.*, 2011). Dessa forma, foi desenvolvida a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que emprega a utilização de diferentes hormônios reprodutivos para sincronização do estro e da ovulação. No entanto, as taxas de concepção nos programas de IATF ainda se encontram baixas, em torno de 50% (BARUSELLI *et al.*, 2019).

Neste contexto, a detecção do estro tem se mostrado crucial para o sucesso dos protocolos de IATF, pois estudos relataram que os animais que não expressam estro anteriormente à inseminação apresentaram comprometimento da fertilidade (RICHARDSON *et al.*, 2016).

Deste modo, a expressão do estro pode constituir um fator primordial para fertilidade aprimorada (RODRIGUES *et al.*, 2018). Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da expressão do estro sobre os índices de fertilidade de fêmeas Nelore submetidas a um programa para IATF.

Material e métodos

Local e animais:

O experimento foi realizado durante os meses de agosto de 2020 à julho de 2021 por meio da coleta e avaliação dos dados da estação de monta realizada no período de dezembro de 2019 a março de 2020 na Fazenda Belo Horizonte, localizada no município de Barra, Bahia. A propriedade adota um sistema extensivo de criação de animais em pastagem com a utilização do capim-buffel (*Cenchrus ciliaris*), suplementação mineral e água ad libitum.

Foram utilizadas 65 fêmeas Nelore lactantes (*Bos taurus indicus*), pluríparas, com escore de condição corporal (ECC) de 3.

Anteriormente ao início do protocolo de IATF, esses animais foram submetidos ao exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, sendo considerados aptos a participarem do experimento os animais sem registro de anormalidades reprodutivas e sem histórico de aborto.



As fêmeas foram manipuladas em conformidade com a Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), BA, Brasil, sob número de protocolo 002/2018.

Protocolo de Sincronização para Inseminação Artificial em Tempo Fixo:

Em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia 0 (D0), as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona associado a 2,0mg de Benzoato de Estradiol por via intramuscular (IM). No dia nove (D9), foi realizada a remoção dos dispositivos e aplicou-se 500µg de cloprostenol sódico IM; 0,6mg de cipionato de estradiol IM e 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina IM.

Neste momento, os animais foram marcados com bastão marcador (RAIDEX, Walmur, Porto Alegre, Brasil) entre a tuberosidade sacral e a inserção da cauda para determinação da expressão do estro.

No dia 11 (D11) os animais foram caracterizados em dois grupos experimentais de acordo com a expressão do estro verificada pela remoção da tinta do bastão marcador: grupo sem expressão do estro (S/ ESTRO) - permanência da cor ou perda parcial da intensidade da tinta e grupo com expressão do estro (C/ ESTRO) - remoção completa da cor e intensidade da tinta. Imediatamente após a caracterização das fêmeas, foram realizadas as IATFs.

Diagnóstico de gestação:

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal no dia 45 (D45), utilizando transdutor linear de 5,0MHz (Sonoscape S2VET).

Delineamento experimental e Análise Estatística:

Os dados foram processados pelo Statistical Package for Social Science (SPSS, versão 19) com nível de significância de 5%. A taxa de concepção entre os grupos C/ ESTRO e S/ ESTRO foram comparadas teste de Qui-quadrado.

Resultados e discussão

No presente estudo, 41,5% das fêmeas bovinas (27/65) não expressaram estro, enquanto que 58,5% (38/65) demonstraram a expressão do estro. Os animais do grupo S/ESTRO obtiveram uma taxa de concepção de 29,6%, já no grupo C/ESTRO, 23 animais tornaram-se gestantes,



perfazendo uma taxa de concepção de 60,5%, sendo observada diferença significativa entre os grupos, como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Comparação da taxa de concepção nos diferentes grupos experimentais após serem submetidos a um Programa para Inseminação Artificial em Tempo Fixo.

Grupos Experimentais	Número de animais	Taxa de concepção (%)
S/ESTRO	27	29,6 (8/27) ^a
C/ESTRO	38	60,5 (23/38) ^b
TOTAL	65	47,7 (31/65)

Letras distintas (a, b) diferem significativamente entre si (P<0,05).

Resultados semelhantes aos deste experimento foram encontrados por Ferraz *et al.* (2017) em seus estudos com vacas Nelore submetidas a um protocolo de IATF, verificaram que dentre animais com alta intensidade de expressão do estro, 60,2% ficaram gestantes e assim, constataram uma relação significativa positiva entre a expressão do estro e a probabilidade de concepção.

O elevado índice de concepção no grupo com a apresentação do estro pode ser explicado por alguns fatores, dentre eles, o tamanho do folículo ovulatório e altas concentrações de estradiol são considerados parâmetros primordiais para uma maior taxa de ovulação e melhor sincronização da ovulação (PERRY *et al.*, 2014). Tendo em vista que quanto maior o diâmetro do folículo pré-ovulatório, maiores serão as concentrações de E2 que irão promover mudanças favoráveis no ambiente endometrial, sendo cruciais para receber e manter o conceito (BRIDGES *et al.*, 2013). Do mesmo modo, em experimentos com fêmeas bovinas, Frade *et al.* (2014), notaram que animais com maior diâmetro do folículo pré-ovulatório, obtiveram maior diâmetro do corpo lúteo e, conseqüentemente, apresentaram maior concentração de P4, favorecendo o estabelecimento da gestação.

Entretanto, a baixa ocorrência do estro está relacionada a concentrações insuficientes de estradiol, que resulta na ineficiência do transporte de espermatozoides e na hostilidade do ambiente uterino, fatores que comprometem a fertilização do oócito (RIBEIRO FILHO *et al.*, 2013). Dessa forma, as fêmeas que não apresentam estro durante um protocolo de IATF obtêm reduzidas taxas de ovulação e fertilidade, fator que explica as baixas taxas de concepção em animais que não expressaram o estro no presente estudo (PEREIRA *et al.*, 2014).



Em vista disso, Santos *et al.* (2018) trabalhando com a influência do estro sobre a fertilidade de novilhas de corte submetidas à IATF, analisaram concepção aos 30 dias, aos 90 dias e taxa de parto. Dessa forma, as novilhas que apresentaram estro obtiveram maiores índices em todas as avaliações, demonstrando alta correlação entre a apresentação do estro com as taxas de concepção e com reduzidas perdas gestacionais.

Neste contexto, Madsen *et al.* (2015) trabalhando com os efeitos do estradiol pré-ovulatório na sobrevivência do embrião e no estabelecimento da prenhez em vacas de corte, indicaram uma diminuição na perda gestacional em vacas expostas à concentrações satisfatórias de E2 durante o período pré-ovulatório. Pereira *et al.* (2014) em seu trabalho verificou ainda um efeito positivo da expressão do estro sobre os índices de fertilidade e das perdas gestacionais, certificando, assim, a importante influência da demonstração do estro nas maiores taxas de concepção.

Conclusão

Em conclusão, a expressão do estro foi associada a um incremento nos índices de fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF. Desse modo, alternativas devem ser adotadas com o intuito de proporcionar que a avaliação da expressão seja inserida como uma estratégia para determinar os animais com uma maior probabilidade de concepção e direcionar acasalamentos em programas de sincronização.

Referências

- BARUSELLI, P.S.; CATUSSI, B.L.C.; ABREU, L.A.; ELLIFF, F.M.; SILVA, L.G.; BATISTA, E.S.; CREPALDI, G.A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, n.2, p. 308–314, 2019.
- BRIDGES, G.A.; DAY, M.L.; GEARY, T.W.; CRUPPE, L.H. Deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. **Journal Animal Science**, v.91, p.3002-3013, 2013.
- FERRAZ, P.A.; LOIOLA, M.V.G.; RODRIGUES, A.S.; LIMA, M.C.C.; BITTENCOURT, T.C.B.S.C.; RIBEIRO FILHO, A.L. Efeito da intensidade da expressão do estro no diâmetro folicular e na fertilidade de vacas Nelore submetidas a um programa de IATF. **Ciência Animal Brasileira**, v.18, p.1-9, 2017.
- FRADE, M.C.; FRADE, C.; CORDEIRO, M.B.; SÁ FILHO, M.; MESQUITA, F.S.; NOGUEIRA, G.P.; BINELLI, M.; BERTAN MEMBRIVE, C.M. Manifestation of estrous behavior and subsequent progesterone concentration at timed-embryo transfer in cattle are



positively associated with pregnancy success of recipients. **Anim Reprod Sci**, v.151, p.85-90, 2014.

MADSEN, C.A.; PERRY, G.A.; MOGCK, C.L.; DALY, R.F.; MACNEIL, M.D.; GEARY, T.W. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. **Anim. Reprod. Sci**, v.158, p. 96-103, 2015.

PEREIRA, M.H.C.; RODRIGUES, A.D.; DE CARVALHO, R.J.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v.97, p.1454-1464, 2014.

PERRY, G.A.; SWANSON, L.; LARIMORE, L.; PERRY, B., DJIRA, G.D. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. **Domest Anim Endocrinol**, v. 48, p.15-20, 2014.

RIBEIRO FILHO, A. de L., FERRAZ, P. A., RODRIGUES, A. S., BITTENCOURT, T. C. B. S. C., LOIOLA, M. V. G., & CHALHOUB, M. (2013). Diâmetro do folículo no momento da inseminação artificial em tempo fixo e taxa de concepção em vacas Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4, p. 501-507, 2013.

RICHARDSON, B.N.; HILL, S.L.; STEVENSON, J.S.; DJIRA, G.D.; PERRY, G.A. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. **Animal Reproduction Science**, v.166, p.133-140, 2016.

RODRIGUES, A.D; COOKE, R.F; CIPRIANO, R.S; SILVA, L.G.T; CERRI, R.L.A; CRUPPE, L.H; MENEGHETTI, M.; POHLER, K.G; VASCONCELOS, J.L.M. Impacts of estrus expression and intensity during a timed-AI protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in *Bos indicus*-influenced beef cows. **Journal Animal Science**, v.96, n.1, p.236-249, 2018.

SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.P.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone- based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v.76, p.455-463, 2011.

SANTOS, J.; HELENA PAZ PRESTES DOS SANTOS, J.; FERNANDES PINTO, H.; MISSIO, D.; WOLFFENBUTTEL CARLOTO, G.; BUSS, V.; GALLAS LEIVAS, F. Expressão do estro relacionado às taxas de fertilidade em novilhas de corte submetidas à IATF. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 10, n. 2, 2018.



FERTILIDADE DE FÊMEAS NELORE SUBMETIDAS À PRÉ-EXPOSIÇÃO COM PROGESTERONA EM UM PROTOCOLO PARA IATF

FERTILITY OF NELORE FEMALES SUBMITTED TO PRE-EXPOSURE WITH PROGESTERONE IN A PROTOCOL FOR FTAI

Wendel Denian Silva dos SANTOS¹; Raquel Gomes do AMARAL¹; Maria Antônia Moreira MACIEL¹; Artur Azevedo MENEZES²; Daniel Bispo FERREIRA¹; Horácio Matheus Gomes ALENCAR³; Antônio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹

¹Centro Multidisciplinar do Campus da Barra, Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil.

²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ), Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

³Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, PB, Brasil.

*E-mail: wendel.santos@ufob.edu.br

Abstract

The objective was to evaluate the influence of pre-synchronization with injectable progesterone (P4) on the fertility rates of acyclic and lactating bovine females in a reproductive program for FTAI. For this, 42 lactating Nelore cows were used, submitted to a synchronization protocol that started on a random day called day - 10 (D-10). At this time, the animals were divided into two treatments: Group P4i (n=23) - 150mg of long-acting injectable progesterone was administered intramuscularly (IM) and Control group (n=19) - 1 mL of saline solution IM. On day zero (D0), an intravaginal device containing 1.0 g of progesterone was inserted, associated with the application of 2.0 mg of estradiol benzoate IM. On day eight (D8) the intravaginal progesterone devices were removed, and the animals received 12.5mg of im dinoprost tromethamine, 300IU of equine chorionic gonadotropin and 1mg of estradiol cypionate IM was applied. The FTAI was performed on day 10 (D10) of the synchronization protocol. On day 23 (D23) the ovulation rate was assessed. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasound on day 40 (D40), 30 days after inseminations, using a 5.0MHz linear transducer. The ovulation rate was similar between the groups. The conception rate was 36.8% in the control group and 50.0% in the P4i group. Despite the positive numerical difference found in the conception rate for the P4i group, there was no statistical difference between the variables analyzed. Thus, P4 ten days before the beginning of the ovulation synchronization protocol was not able to increase the ovulation rate, but it promoted a numerical increase in the fertility rates of acyclic bovine females.

Keywords: Fertility, Ovulation, Pre-synchronization, Progesterone.

Introdução

A Inseminação Artificial (IA) é uma técnica que possibilita o melhoramento genético por meio da utilização de gametas de animais de alto potencial zootécnico. No entanto, devido a falhas na detecção de estro e o anestro pós-parto, a IA convencional caracteriza-se por baixas taxas



de serviços, o que representa o principal entrave para a disseminação desta biotecnologia reprodutiva (BARUSELLI *et al.*, 2017).

Neste contexto, o desenvolvimento da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), surgiu para reduzir os fatores que comprometem o sucesso na IA convencional (BARUSELLI *et al.*, 2019). No entanto, em média 50% das fêmeas sincronizadas para realização de IATF concebem no primeiro serviço após o parto (BARUSELLI *et al.*, 2012).

Nesse sentido, a deficiência nutricional, aliada ao período de lactação e a presença do bezerro ao pé, são fatores que desencadeiam o anestro pós-parto nas fêmeas bovinas, e como consequência, prolongam o intervalo entre partos, impactando negativamente os resultados dos programas de IATF (BARUSELLI *et al.*, 2017). Como alternativa para contornar os problemas ocasionados pela lactação e anestro pós-parto no manejo reprodutivo de bovinos, alguns experimentos têm indicado o uso da pré-sincronização com progesterona (P4) injetável em programas de IATF (SIMÕES *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2019).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência da pré-sincronização com P4 injetável sobre os índices de fertilidade de fêmeas bovinas acíclicas e lactantes em programa reprodutivo para IATF.

Material e métodos

Local e Animais:

O experimento foi realizado entre os meses de agosto de 2021 a julho de 2022 na Fazenda Belo Horizonte, localizada no município de Barra, região Oeste da Bahia.

Foram utilizadas 42 fêmeas da raça Nelore lactantes com em média 50 a 60 dias de pós-parto, plurípara, escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 a 2,75 (escala de 1 a 5) e com ausência de corpo lúteo. Previamente ao início da sincronização, no dia -10 (D-10), as vacas foram submetidas a um exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal, sendo consideradas aptas ao experimento, as fêmeas que apresentaram no momento da avaliação ausência de corpo lúteo e de anormalidades no trato reprodutivo.

Protocolo de sincronização:

As fêmeas foram submetidas a um protocolo de sincronização que se iniciou em um dia aleatório denominado como dia -10 (D-10). Neste momento, os animais foram divididos



aleatoriamente em dois tratamentos: Grupo P4i (n=23) – se administrou 150mg de progesterona injetável de longa ação por via intramuscular (IM) e Grupo controle (n=19) - foi realizada a aplicação 1mL de solução fisiológica IM. No dia zero (D0), foi feita a inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1,0g de progesterona, associado à aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol IM. No dia oito (D8) foi realizada a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona, e os animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina IM, 300UI de gonadotrofina coriônica equina IM e se aplicou 1mg de cipionato de estradiol IM. A IATF foi realizada no dia 10 (D10) do protocolo de sincronização.

Avaliações Ultrassonográficas:

No dia 23 (D23) os animais foram examinados por ultrassonografia em modo B (Sonoscape S2VET), nas avaliações foi empregado um transdutor linear com frequência de 7,5 MHz para determinar a presença do corpo lúteo, sendo calculada a taxa de ovulação pela proporção entre o total de animais com presença de corpo lúteo e o total de animais submetidos ao protocolo de sincronização.

Diagnóstico de gestação:

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal no dia 40 (D40), 30 dias após as inseminações, utilizando transdutor linear de 5,0MHz (Sonoscape S2VET). Foi considerado diagnóstico de gestação positivo, os animais com presença de um embrião visível. A taxa de concepção foi calculada dividindo o total de vacas gestantes pelo total de vacas inseminadas.

Análise Estatística:

Os dados foram processados usando o Statistical Package for Social Science (SPSS, versão 19) considerando um nível de significância de 5%. Para tanto, realizou-se a seguinte sequência de análises: 1- A média e desvio-padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva; 2- As taxas de concepção e de ovulação entre os grupos P4i e controle foram confrontadas empregando um estudo de dispersão de frequências pelo teste de Qui-quadrado.



Resultados e discussão

No presente experimento, os resultados encontrados para a taxa de ovulação foram semelhantes entre os grupos. O grupo controle apresentou 84,2% e o grupo P4i obteve 87,0%, não diferindo entre si ($P>0,05$) (tabela 1).

Tabela 1 - Efeito da exposição a P4 injetável no dia -10 (D-10) do protocolo de sincronização sobre a taxa de ovulação e a taxa de concepção em fêmeas Nelore acíclicas.

Grupos experimentais	Nº de Animais	Taxa de ovulação (%)	Taxa de concepção (%)
Controle	19	84,2 (16/19)	36,8 (7/19)
P4i	23	87,0 (20/23)	50,0 (11/22)
Total	42	85,7 (36/42)	43,9 (18/41)

Controle= grupo controle; P4i= grupo tratamento; $P>0,05$.

Os achados deste estudo estão de acordo com Carôso (2022), onde trabalhando com receptoras zebuínas em um programa de Transferência de Embrião em Tempo Fixo (TETF), submetidas a pré-exposição com P4i antes do início do protocolo de sincronização do estro, obteve taxa de ovulação de 89,6% (Controle = 87,5% e P4i = 91,7%). Corroborando com tais resultados, Simões *et al.* (2018), avaliaram o efeito da pré-exposição com progesterona injetável (P4i) em um protocolo de IATF em primíparas Nelore, não encontrando diferenças na taxa de ovulação entre os grupos controle e P4i, sendo de 78,20% e 80,30%, respectivamente.

Contudo, se levarmos em consideração que as fêmeas bovinas utilizadas nesse estudo apresentavam ausência de corpo lúteo no ovário e ECC abaixo de 2,75 no momento da administração da P4, a taxa de ovulação encontrada foi satisfatória, dado que em protocolos de sincronização da ovulação a média relatada é 75 a 85% (SÁ FILHO *et al.*, 2011). Tendo em vista que fêmeas bovinas acíclicas possuem o aporte hipofisário gonadal comprometido em decorrência a fatores pós-parto como balanço energético negativo e a lactação, há uma redução nos níveis de GnRH e, em especial, LH, afetando, assim, taxa de ovulação (SALES *et al.*, 2019).

Neste estudo também verificou-se taxa de concepção de 36,8% no grupo controle e de 50,0% no grupo P4i (tabela 1). Apesar da diferença numérica positiva encontrada na taxa de concepção para grupo P4i, não houve diferença estatística entre as variáveis analisadas. Santos *et al.* (2018) trabalhando com fêmeas Nelore lactantes e com ECC de 2,9 (escala de 1 a 5), não



encontraram efeito do tratamento com P4 prévia no protocolo de sincronização para IATF sobre taxa de concepção. Entretanto, contrapondo a esses resultados supracitados, Simões et al. (2018), encontraram resultados positivos do efeito da P4 sobre a taxa de concepção de fêmeas zebuínas, submetidas a pré-exposição com P4 antes do início do protocolo de sincronização da ovulação para IATF, onde obtiveram taxa de concepção de 45,90% para o grupo tratamento e 34,90% ($P=0,03$) para o grupo controle.

Em revisão, Sales et al. (2019) sugere que os divergentes resultados encontrados nos trabalhos envolvendo o uso da P4 como estratégia para incrementar as taxas de concepção em protocolos de IATF, deve-se, principalmente, ao estado de condição corporal das fêmeas nos diferentes experimentos. Onde vacas no pós-parto comprometidas nutricionalmente produzem metabólitos, endorfinas e peptídeos, que agem no hipotálamo bloqueando a secreção de GnRH e consequente menor pulsatilidade de LH.

Dessa forma, como efeito ao tratamento com P4i pode ter ocorrido um aumento na secreção de LH, diminuindo a ocorrência de ciclos de curta duração e consequente incremento na taxa de concepção (SALES *et al.*, 2019).

Rocha (2011) explica também que a progesterona está relacionada a preparação do ambiente uterino, promovendo modificações no endométrio uterino, em consequência a prévia exposição a P4, proporcionando condições adequadas para reconhecimento, desenvolvimento e manutenção da gestação, aumentando a taxa de concepção no pós-parto.

Conclusão

Desse modo, podemos concluir que o tratamento com P4 dez dias antes do início do protocolo de sincronização da ovulação para IATF, não foi capaz de aumentar a taxa de ovulação e incrementar os índices de fertilidade das fêmeas bovinas acíclicas.

Referências

- BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N. S.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 139-152, 2012.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L.; DE FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558-571, 2017.



BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; ABREU, L. A.; ELLIFF, F. M.; SILVA, L. G.; BATISTA, E. S.; CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 2, p. 308–314, 2019.

CARÔSO, B. S. S. **Exposição à progesterona antes do início do protocolo de sincronização da ovulação para TETF em receptoras zebuínas**. 2022. 48 p. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, 2022.

ROCHA, D.C. **Utilização de progesterona injetável de longa ação no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas de corte**. 2011. 86 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

SÁ FILHO, M. F., SANTOS, J. E. P., FERREIRA, R. M., SALES, J. N. S., & BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 455-463, 2011.

SALES, J. N. S.; SIMÕES, L. M. S.; ORLANDI, R. E.; LIMA, E. A.; SANTOS, A. P. C.; BOTTINO, M. P.; SILVA, L. A. C. L.; SOUZA, J. C.; DIAS, M. M.; MASSONETO, J. P. M.; SCANDIUZZI JR, L. A.; FREITAS, B. G.; GUERREIRO, B. M.; BASTOS, M. R. Pre-TAI protocol strategies to increase reproductive efficiency in beef and dairy cows. **Animal Reproduction**, v.16, n.3, p. 402-410, 2019.

SANTOS, A. P. C.; ORLANDI, R. E.; BOTTINO, M. P.; SIMÕES, L. M. S.; LIMA, E. A.; SILVA, A. G.; GUERREIRO, B. M.; BASTOS, M. R.; FREITAS, B. G.; BERTONCINI, F. L. S.; SANTOS, J. A.; SALES, J. N. S. Effect of circulating progesterone concentration during synchronization for fixed-time AI on ovulation and fertility in *Bos indicus* (Nelore) beef cows. **Anais da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 2018.

SIMÕES, L. M. S.; ORLANDI, R. E.; MASSONETO, J. P. M.; SCANDIUZZI JR, L. A.; FREITAS, B. G.; BASTOS, M. R.; SOUZA, J. C.; SALES, J. N. S. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 116, p. 28-33, 2018.

SIMÕES, L. M. S., LIMA, E. A., MARTIEZ, M. B. P., ZANATTA, G. M., MASSONETO, J. P. M., SANTOS, M. F. O., MACHADO, A. B., DIAS, M. M., GUERREIRO, B. M., FREITAS, B. G. F., BASTOS, M. R., SALES, J. N. S. Progesterone pre-exposition to ovulation synchronization protocol increases follicular diameter and pregnancy rate in *Bos taurus* and *Bos indicus* suckled beef cows. **Anim. Reproduction.**, v.16, n.3, p.573, Jul./Sept. (Resumo) 2019.



HISTOLOGIA UTERINA DE FETO BOVINO EM DIFERENTES IDADES GESTACIONAIS

UTERINE HISTOLOGY OF BOVINE FETUSES AT DIFFERENT GESTATIONAL AGES

Camilla Giovanna Peixoto VIEIRA^{1*}; Larissa Cristina Silva TEIXEIRA¹, Juliana Vasconcelos FIGUEIREDO¹; Bruno Porpino HOMOBONO², Nathalia Nogueira da Costa de ALMEIDA²; Simone do Socorro Damasceno SANTOS²; Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO¹; Sebastião Tavares Rolim FILHO¹

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, ISPA, Belém, PA, Brasil.

²Laboratório de Fertilização *In Vitro*, Instituto de Ciências Biológicas, UFPA, Belém, PA, Brasil.

*camillagpv@gmail.com

Abstract

This work seeks to histologically describe the fetal uterus of the female bovine, from the predominance epithelium to when the signs of tissue dissentiation (epithelium, endometrium, myometrium and perimetrium), as well as the glandular and caruncular primordia, in the analyzed gestational ages. The uterus used are from 24 bovine fetuses - 3 to 8 months old, collected from a slaughterhouse in the city of Belém - PA, processed and the tissue analyses were performed by optical microscopy (Eclipse Ci-S/Nikon). The results showed the predominant lining epithelium of the fetal uterine mucosa is simple columnar with points of pseudostratification; it is not possible to identify the beginnings of caruncular buds; at 3 and 4 months of gestational age the beginning of myometrial muscle fiber differentiation is already observed; the primordia of the endometrial glandulars appear between 5 and 6 months of gestational age; the pleating of the uterine mucosa is observed from 6 months of gestational age; and the distinction of the layers occurs earlier in the body of the uterus than in the uterine horns.

Keywords: cow, fetus, uterus, bovine, histogenesis.

Introdução

O útero é um dos principais órgãos do aparelho reprodutivo das fêmeas e desempenha função importante na gestação/parto (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Na literatura, é bastante descrito anatomo-histologicamente nos diferentes estágios da vida reprodutiva de fêmeas adultas (MONTEIRO *et al.*, 2003; MARQUES *et al.*, 2007; FAROUK *et al.*, 2012); porém poucos estudos abordam o desenvolvimento do útero pré-natal (MOUSTAFA; HAFEZ, 1971; WILEY *et al.*, 1987).

Em bovinos a organogênese é inicialmente semelhante para fêmea e para o macho finalizando-se após a diferenciação aos 45 dias de idade gestacional; nesta fase, o útero da fêmea é formado a partir da união caudal dos ductos de Müller que dão origem à estrutura de aspecto



bicornual convoluta e alongada. Posteriormente, na fase fetal essas estruturas orgânicas ganharão a aparência do órgão de um indivíduo adulto com a distinção do epitélio e camadas, o surgimento das glândulas endometriais cominando em consistência, comprimento, largura e aumento de peso (HAFEZ; HAFEZ, 2004; PRESTES; LANDIM-ALVARENGA, 2017).

A intensificação de estudos que demonstrem a importância desse conhecimento pré natal em ruminantes, abre um caminho para a maximização desses efeitos na economia produtiva (COSTA *et al.*, 2020); atuando em um maior reaproveitamento reprodutivo da fêmea e matriz. Portanto, esse trabalho busca descrever histologicamente o útero de fetos bovinos, desde o epitélio de predominância até em que momento ocorrem os indícios de diferenciação dos tecidos (Epitélio, Endométrio, Miométrio e Perimétrio), bem como os primórdios glandulares e carunculares, nas idades gestacionais analisadas.

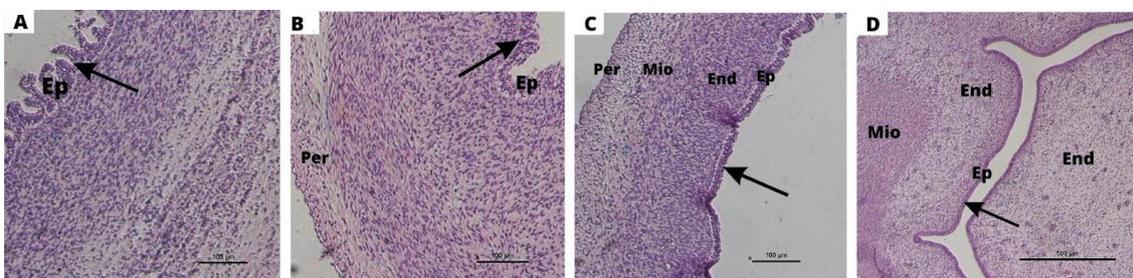
Material e Métodos

Foram utilizados 24 fetos fêmeas bovinos, entre 3 a 8 meses de idade gestacional, coletados em abatedouro frigorífico no município de Belém - PA. A idade gestacional foi determinada através da mensuração occípito-sacral ("Crown-Rump"/CR) de Winters et al. (1942). O útero fetal foi coletado, dissecado e processado para histologia convencional e analisado em microscópio óptico digital Eclipse Ci-S (Nikon).

Resultados e Discussão

Na figura 1, observa-se a presença de epitélio pseudoestratificado dos 3 - 5 meses de idade gestacional e já aos 6 meses, o epitélio predominante é o colunar simples, e neste mesmo período, nota-se o pregueamento uterino de forma mais precoce em relação aos achados de Moustafa e Hafez (1971), que afirmam que o epitélio aos 4 meses de idade é pseudoestratificado e volta a ser colunar simples somente aos 8 meses de idade, juntamente com a presença do pregueamento uterino.

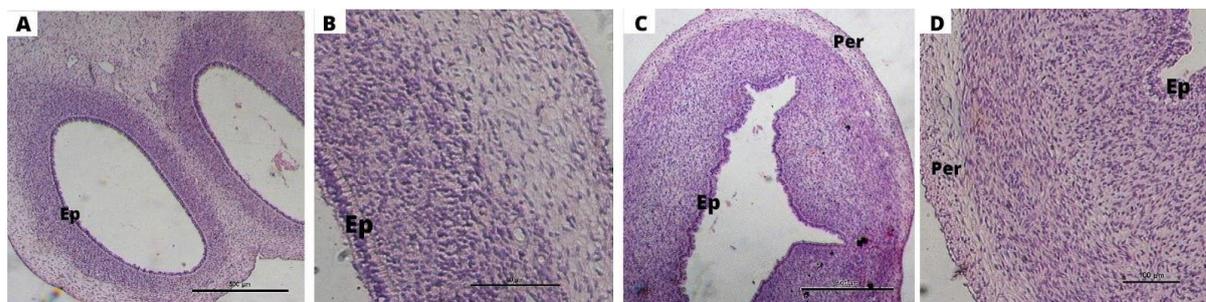
Figura 1 - Fotomicrografia uterina de fetos bovinos dos 3 aos 6 meses de idade gestacional. Setas: Indicando o epitélio. Epitélio (Ep); Miométrio (Mio); Perimetrio (Per); Endométrio (End). A - Epitélio com pontos de pseudostratificação - 3 meses (obj. 20); B - Epitélio com pontos de pseudostratificação - 4 meses; C - Epitélio colunar com pseudostratificação - 5 meses (obj. 20); D - Epitélio Colunar Simples - 6 meses (Obj. 4). Corte Transversal. Hematoxilina e Eosina.



Ainda sobre o epitélio, Wiley *et al.* (1987) pontua a predominância do epitélio colunar simples em ovinos, já Monteiro *et al.* (2003) menciona que em vacas há variações do epitélio colunar simples e o cúbico simples, e este último é comumente descrito como presente em fêmeas adultas fortemente ligado às fases do ciclo ovariano. Porém, em todos os 24 fetos analisados no trabalho, não há indícios de células cubóides no revestimento interno do lúmen.

Na figura 2, nota-se, aos 3 - 4 meses de idade, o espaço luminal sem irregularidade no epitélio e sem os primórdios dos botões carunculares descritos por Wiley *et al.* (1987) e Kenngott *et al.* (2016), que afirmam o surgimento dos mesmos aos 90 dias em bovinos.

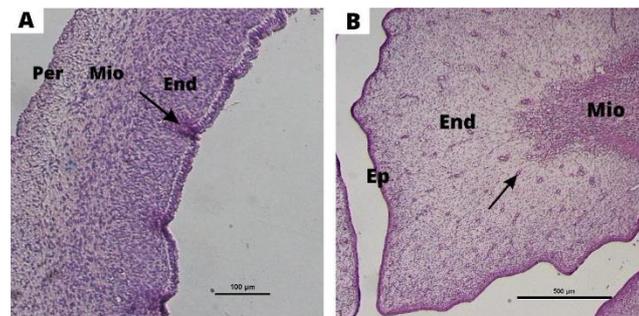
Figura 2 - Fotomicrografia uterina fetal de bovino dos 3 e 4 meses de idade gestacional. Epitélio (Ep); Perimetrio (Per); Endométrio (End). A e B - Lúmen dos cornos uterinos com aspecto tubular e regular - 3 meses de idade (obj. 4 e 20); C e D - Lúmen do corpo sem irregularidades no epitélio - 4 meses de idade (obj. 4 e 20). Corte Transversal. Hematoxilina e Eosina.



Na figura 3, aos 5- 6 meses de idade, notam-se áreas irregulares no lúmen, semelhantes aos botões carunculares, sendo possível também observar invaginações do epitélio que marcam

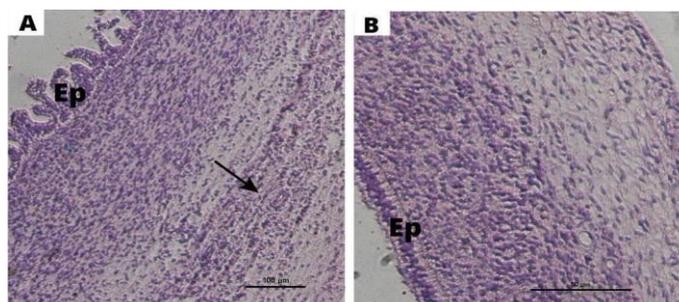
o início do desenvolvimento dos primórdios glandulares que refutam os escritos de Moustafa e Hafez (1971), onde mencionam esse surgimento somente a partir de 8 meses de idade fetal.

Figura 3 - Fotomicrografia de útero fetal bovino aos 5 e 6 meses de idade gestacional. Epitélio (Ep); Miométrio (Mio); Perimétrio (Per); Endométrio (End). A - Seta indicando invaginações no epitélio do corpo do útero - 5 meses (obj. 4); B - Seta indicando os primórdios glandulares em feto com 6 meses de idade gestacional (obj. 4). Corte Transversal. Hematoxilina e Eosina.



Sobre o endométrio, a diferenciação tecidual não apresentou divergência dos achados de Monteiro *et al.* (2003) e Kenngott *et al.* (2016). Porém, o miométrio apresentou um surgimento precoce dos precursores de células de musculatura lisa no corpo do útero, conforme mostrado na figura 4; o que antes na literatura só havia sido descrito aos 5 meses de idade gestacional por Monteiro *et al.* (2003) e Kenngott *et al.* (2016). A camada Perimétrio estava presente em todas as fases analisadas e condizente com as realidades presentes na literatura por Moustafa e Hafez (1971); Gray *et al.* (2001).

Figura 4 - Fotomicrografia corpo de útero de feto bovino - 3 meses. Epitélio (Ep). A - Seta: Precursores do miométrio (obj. 20). Corte Transversal. Hematoxilina e Eosina.





E as hipóteses levantadas por Wiley *et al.* (1987), em ovinos, sobre a diferenciação dos tecidos ocorrer de forma mais precoce no corpo do útero que nos cornos uterinos, também se ratifica neste estudo, aplicado à histogênese do útero fetal bovino.

Conclusão

Conclui-se que no período gestacional analisado, o epitélio de revestimento predominante da mucosa uterina fetal é o colunar simples com pontos de pseudoestratificação; não sendo possível identificar os primórdios dos botões carunculares; aos 3 e 4 meses de idade gestacional já se observam o início da diferenciação das fibras musculares do miométrio; os primórdios das glandulares endometriais aparecem entre 5 e 6 meses de idade gestacional; o pregueamento da mucosa uterina é observado a partir de 6 meses de idade gestacional; e a distinção das camadas ocorre de forma mais precocemente no corpo do útero que nos cornos uterinos.

Referências

- COSTA, H. D. S., VENCESLAU, C. F., FERNANDES, B. F. V., BEZERRA, D. M. C. E., FERNANDES, P. A., RODRIGUES, S. A., & FRANCO, D. O. M. Desenvolvimento embrionário/fetal, placentação e glicosaminoglicanos no aparelho reprodutor feminino e na placenta. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, 2020.
- FAROUK, S. M., OSMAN, A. K., HUSSIEN, H. E. Histogenesis of uterine body and horns of the one humped camel (*Camelus dromedarius*). **SCUVMJ**, XVII (1), 133 - 151, 2012.
- GRAY, C. A., BARTOL, F. F., TARLETON, B. J., WILEY, A. A., JOHNSON, G. A., BAZER, F. W., & SPENCER, T. E. Developmental biology of uterine glands. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1311-1323, 2001.
- HAFEZ, E. S. E., HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7a edição, São Paulo., 2004.
- KENNGOTT, RA-M., SCHOLZ, W., SINOWATZ, F. Ultrastructural aspects of the prenatal bovine ovary differentiation with a special focus on the interstitial cells. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 45, n. 5, p. 357-366, 2016.
- MARQUES, R. D. S., VULCANO, M., CAZERTA, S. M., MIGLINO, M. A., DE ASSIS NETO, A. C., & PEREIRA, F. T. V. Caracterização morfológica da região intercaruncular uterina de vacas e búfalas gestantes. **Biotemas**, v. 20, n. 3, p. 103-114, 2007.
- MONTEIRO, C. M. R., CARVALHAL, R., PERRI, S. H. V. Caracterização morfológica do útero e tubas uterinas de fetos bovinos da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*) em diferentes



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

fases de gestação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 416-423, 2003.

MOUSTAFA, L. A.; HAFEZ, E.S. Prenatal development of the bovine reproductive system. **Journal of Reproductive Medicine**. v. 7, n. 3, p.99-113, 1971.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. L. **Obstetrícia veterinária**. 2ª edição, São Paulo. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2017.

WILEY, A. A.; BARTOL, F. F., BARRON, D. H. Histogenesis of the ovine uterus. **J. Anim. Sci.**; 64:1262–1269, 1987.

WINTERS L.M., GREEN W.W. & COMSTOCK R.E. Prenatal development of the bovine. **Univ. Agric. Exp. Sta. Minnesota Techn. Bull.** 151:3-50, 1942.



**IMPACTO DA EXPRESSÃO DO ESTRO SOBRE CARACTERÍSTICAS
MORFOFUNCIONAIS LUTEAIS DE FÊMEAS NELORE SINCRONIZADAS PARA
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO**

**EFFECT OF THE ESTRUS EXPRESSION ON FOLLICULAR AND LUTEAL
MORPHOFUNCTIONAL CHARACTERISTICS AND FERTILITY IN *Bos indicus* FEMALES
SYNCHRONIZED FOR FTAI**

Artur Azevedo Menezes²; Raquel Gomes do Amaral¹; Maria Antônia Moreira Marcial¹; Wendel Denian Silva dos Santos¹; Marcus Vinícius Galvão Loiola²; Rodrigo Freitas Bittencourt²; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho²; Alexandra Soares Rodrigues¹

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

*E-mail: arturmenezes@ufba.br

Abstract

The objective of this study this work was evaluate the impact of the estrus expression on luteal and fertility morphofunctional characteristics of Nelore females synchronized for timed artificial insemination (TAI). Sixty-five lactating female Nelore (*Bos taurus indicus*) were used. On a random day, denominated day 0 (D0), the 65 females Nelore females received a progesterone-releasing device associated to the application of 2.0 mg of estradiol benzoate intramuscularly (IM). On D9, the progesterone-releasing intravaginal devices were removed and was administered 500 µg of cloprostenol sodium IM; 0.6 mg of estradiol cypionate IM and 300 UI of Equine Chorionic Gonadotropin IM. At this point, the animals were marked with a marking stick for the determination of the estrus expression. On D11 of the synchronization protocol, the animals were characterized in two groups: without estrus expression WITHOUT ESTRUS and with estrus expression WITH ESTRUS. The evaluation of the corpus luteum diameter (CLD), the total area of the corpus luteum (CLA), of the area of vascularization of the corpus luteum (CLV), of the percentage of vascularization of the in the area of the corpus luteum (% CLV) and the collection of blood for the evaluation of the serum levels of progesterone were carried out on D24. The analysis of the serum progesterone concentration were performed by the chemiluminescence method using the Access Immunoassay Systems Progesterone, with a sensitivity of 0.1 ng/mL. The pregnancy diagnosis was carried out by transrectal ultrasonography on D45. The animals of the WITH ESTRUS group exhibited averages for CLD, CLA, CLV and P4 significantly higher than those of the WITHOUT ESTRUS group. However, the bovines of the WITH ESTRUS group presented a % CLV similar to the presented by the females of the WITHOUT ESTRUS group. Therefore, the estrus detection can be used as a tool to direct matings in synchronization protocols, promoting the identification of the animals with a higher probability of conception, owing to better follicular and luteal hemodynamic conditions.

Introdução

O aprimoramento e o desenvolvimento de tecnologias com o intuito de aumentar a produtividade nas propriedades, maximizando os sistemas de criação e rentabilidade dos rebanhos



é imprescindível. Entre as tecnologias desenvolvidas, as biotecnologias reprodutivas merecem destaque. Com o objetivo de facilitar a utilização da IA nas propriedades rurais foi desenvolvida a tecnologia de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (LAMB; MERCADANTE, 2016). Apesar da evolução alcançada pelas modernas técnicas de sincronização, os resultados obtidos em rebanhos comerciais ainda são baixos, com índices de fertilidade variando entre 40 a 50%. (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

Diante desse cenário, diversas pesquisas observaram que em vacas submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação que apresentavam o comportamento de estro, possuíam grandes dimensões luteais e altos níveis séricos de progesterona no período pós-ovulatório, sugerindo, assim, que pode existir uma correlação entre expressão do estro e parâmetros morfofuncionais luteais (PEREIRA *et al.*, 2016). Entretanto, a literatura apresenta uma escassez de relatos que venham a comprovar a relação entre a expressão de estro e a intensidade de fluxo sanguíneo luteal.

Em vista disso, esse estudo tem como objetivo comparar as diferenças entre as características morfofuncionais do corpo lúteo de vacas com distintos comportamentos de estro submetidas a um programa para IATF.

Material e métodos

Local e Animais:

O experimento foi realizado durante os meses de agosto de 2020 até julho de 2021 por meio da coleta e avaliação dos dados da estação de monta realizada no período de dezembro de 2019 a março de 2020 na Fazenda Belo Horizonte, localizada no município de Barra-BA.

Foram utilizados dados de 65 fêmeas Nelore lactantes, múltipara, escore de condição corporal (ECC) de 3. Foram coletadas as informações apenas de vacas submetidas ao exame clínico-ginecológico e ultrassonografia transretal sem registro de anormalidades reprodutivas e sem histórico de aborto. Foram utilizados dados de animais manipulados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais.

Protocolo de sincronização:

Em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia 0 (D0) receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona associado a 2,0mg de Benzoato de Estradiol por via intramuscular (IM). No dia nove (D9), realizou-se a remoção dos dispositivos intravaginais de



progesterona e se aplicou-se 500µg de cloprostenol sódico IM; 0,6mg de cipionato de estradiol IM e 300UI de Gonadotrofina Coriônica Equina IM.

Neste momento, os animais foram marcados com bastão marcador (RAIDEX, Walmur, Porto Alegre, Brasil) entre a tuberosidade sacral e a inserção da cauda para determinação da expressão do estro.

No dia 11 (D11) do protocolo de sincronização, os animais foram caracterizados em dois grupos experimentais de acordo com a expressão do estro verificada pela remoção da tinta do bastão marcador: Grupo Sem expressão do estro (S/ ESTRO)- permanência da cor ou perda parcial da intensidade da tinta e Grupo com expressão do estro (C/ ESTRO)- remoção completa da cor e intensidade da tinta. Imediatamente após a caracterização das fêmeas, foram realizadas as IATFs.

Avaliações Ultrassonográficas:

Os parâmetros luteais foram determinados por meio da avaliação do corpo lúteo (CL) por ultrassonografia modo B e Doppler colorido no dia 24 (D24) do protocolo de sincronização. Após a localização do ovário, o mesmo foi analisado por ultrassonografia em modo B e modo Doppler para mensuração do diâmetro do CL (DCL), da área total do CL (ACL), da área de vascularização do CL (VCL) e do percentual de vascularização na área do CL (%VCL).

Coleta de Sangue e Ensaio Hormonal:

As análises da concentração de progesterona foram realizadas no dia 24 (D24) do protocolo de sincronização pela metodologia de quimioluminescência utilizando o imunoensaio *Access Immunoassay Systems Progesterone* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), conforme especificações do fabricante no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia, com uma sensibilidade de 0,1ng/mL. Foram realizados dois ensaios e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 6,2% e 3,5%, respectivamente.



Delineamento Experimental e Análise Estatística:

Os dados foram processados pelo SPSS, versão 19, com nível de significância de 5%. As diferenças das características morfofuncionais do corpo lúteo (DCL, VCL, %VCL e P4) entre os animais C/ ESTRO e S/ ESTRO serão comparados por meio do teste t de *Student*.

Resultados e discussão

No presente trabalho, 41,53% das fêmeas (27/65) não expressaram estro e 58,46% (38/65) expressaram estro. Os animais do grupo COM ESTRO esboçaram médias para DCL, ACL, VCL e P4, significativamente mais elevadas ($P < 0.05$) que no grupo SEM ESTRO, conforme representado na Tabela 1. Contudo, os bovinos do grupo COM ESTRO apresentaram %VCL semelhante àquele apresentado pelas fêmeas do grupo SEM ESTRO (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão (S) do DCL, ACL, VCL, %VCL e da progesterona pós-ovulatória (P4) de acordo com a expressão do estro de fêmeas bovinas Nelore submetidas a um programa de sincronização.

Grupos experimentais	DCL	ACL	VCL	%VCL	P4
	Média±S (cm)	Média±S (cm)	Média±S (cm)	Média±S (%)	(ng/mL)
SEM ESTRO	1,80 ± 0,28 ^a	2,62 ± 0,69 ^a	0,92 ± 0,33 ^b	36,39 ± 12,48	8,35 ± 6,63 ^a
COM ESTRO	2,00 ± 0,28 ^a	3,37 ± 0,78 ^a	1,31 ± 0,43 ^a	39,42 ± 11,59	12,19 ± 5,55 ^a
TOTAL	1,95 ± 0,25	3,17 ± 0,76	1,23 ± 0,43	38,52 ± 11,38	10,74 ± 5,81

^{a,b} Letras distintas dentro das colunas indicam diferença entre si pelo teste t de *Student* ($P < 0.05$).

No que se refere as características morfológicas, sendo elas o DCL e a ACL, Rodrigues *et al.* (2018) buscando avaliar a influência do estro sobre o diâmetro luteal de vacas submetidas a IATF, averiguaram que as fêmeas que apresentavam o comportamento do estro antes do momento da inseminação propriamente dita, apresentaram maiores dimensões luteais. De forma similar, Sá Filho *et al.* (2011) constataram distinções entre as fêmeas que apresentaram estro e as que não demonstraram estro, obtendo média de $22,9 \pm 3,0$ mm e $20,3 \pm 3,9$ mm, respectivamente. Nesse contexto, Murdoch e Van Kirk (1998) apontaram uma estreita correlação entre altas concentrações de estradiol e uma maior proliferação das células da granulosa que após a ovulação se tornaram as grandes células luteais, sendo estas responsáveis por 80% da produção de progesterona, justificando, assim, os achados do presente estudo.



Entretanto, no que se refere a diferença apresentada entre os grupos para a característica VCL, existe uma escassez de relatos na literatura que venham comprovar a relação entre a expressão de estro e a vascularização luteal. Diante desse cenário, Bollwein *et al.* (2016) em seu estudo de revisão sobre o uso da ultrassonografia modo Doppler para avaliação luteal de fêmeas bovinas, verificaram maior vascularização luteal nos animais com elevada produção de progesterona e melhores índices de concepção. Corroborando com esses achados, a literatura tem demonstrado que vacas com baixa vascularização luteal durante o diestro, tendem a apresentar baixas concentrações de progesterona e reduzidas taxas de concepção, visto que, são necessárias concentrações suficientes de progesterona para a manutenção de condições uterinas favoráveis ao desenvolvimento embrionário e ao estabelecimento da gestação. Deste modo, a mensuração da vascularização, nesta estrutura ovariana, pode fornecer importantes informações sobre a função luteal e o índice de fertilidade em fêmeas bovinas (HASSAN *et al.*, 2018).

Quanto aos níveis séricos de progesterona, Cavalieri *et al.* (2018) trabalhando com fêmeas *Bos Indicus*, observaram uma maior concentração de P4 para o grupo que expressou estro antes do momento da inseminação artificial propriamente dita. Ainda nesse contexto, Edwards et al. (2015) e Pereira *et al.* (2016) trabalhando com novilhas fêmeas *Bos Indicus* sincronizadas para um programa de IATF, apontaram que além de apresentarem maiores níveis séricos de P4, o grupo com estro também apresentou uma maior taxa de fertilidade.

Dessa forma, a detecção do estro por meio do uso do bastão marcador, além de fácil utilização, promove a identificação dos animais com maior probabilidade de apresentar aspectos luteais mais propensos ao estabelecimento de uma gestação. Assim, a intensidade da expressão do estro pode ser usada para predizer acasalamentos por meio da seleção de fêmeas que possam receber sêmen sexado ou altamente valorizado, otimizando a utilização desse material genético com o intuito do melhoramento genético em rebanhos bovinos.

Conclusão

Desta forma, a detecção do estro pode ser usada como ferramenta para direcionar acasalamentos em protocolos sincronização, promovendo a identificação dos animais com maior probabilidade de concepção, por apresentar melhores condições hemodinâmicas luteais o qual está relacionado a melhores condições uterinas para o estabelecimento da gestação.



Referências

- BOLLWEIN, H.; HEPPELMANN, M.; LÜTTGENAU, J. Ultrasonographic Doppler use for female reproduction management. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. 32(1): 149-164. 2016.
- CAVALIERI, J.; GAINA, C.; HEPWORTH, G. Randomised controlled trial of the effect of concentration of progesterone before artificial insemination on fertility in ovulatory and anovulatory *Bos indicus* cattle. **Australian Veterinary Journal**. 378 96(9): 346-355. 2018.
- EDWARDS, S.A.A.; BO, G.A.; CHANDRA, K.A.; ATKINSON, P.C.; MCGOWAN M.R. Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial insemination or artificial insemination after estrus detection in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**. 83(1): 114-120. 2015.
- HASSAN M.; ARSHAD U.; BILAL M.; SATTAR A.; AVAIS M.; BOLLWEIN H.; AHMAD N. Luteal blood flow measured by Doppler ultrasonography during the first three weeks after artificial insemination in pregnant and non-pregnant *Bos indicus* dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**. 65., n.1, p.29-36. 2018.
- LAMB, G. C.; MERCADANTE, V. R. G. Synchronization and artificial insemination strategies in beef cattle. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v.32, p.335-334, 2016.
- MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. **Endocrinology**. 139: 3480-3484. 1998.
- PEREIRA M.H.C.; WILTBANK M.C.; VASCONCELOS J.L.M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **Journal Dairy Science**. 99, n.3, p.2237-2247. 2016.
- RODRIGUES, A.D.; COOKE, R.F.; CIPRIANO, R.S.; SILVA, L.G.T.; CERRI, R.L.A.; CRUPPE, L.H.; MENEGHETTI, M.; POHLER, K.G.; VASCONCELOS, J.L.M. Impacts of estrus expression and intensity during a timed-AI protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in *Bos indicus*-influenced beef cows. **Journal Animal Science**. 96(1): 236-249. 2018.
- SÁ FILHO, M. F.; SANTOS, J. E. P.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Importance of estrus on pregnancy submitted to estradiol/progesterone- based timed insemination protocols. **Theriogenology**. V.76, p.455-463, 2011.
- VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; WILTBANK, M. C.; GUIDA, T. G.; LOPES JR., F. R.; SANCHES JR., C. P.; BARBOSA, L. F. S. P.; COSTA JR., W. M.; MUNHOZ, A. K. Evolution of fixed-time AI in dairy cattle in Brazil. **Animal Reproduction**, v.15, p.940-951. 2018.



INFLUÊNCIA DA PRÉ-SINCRONIZAÇÃO COM PROGESTERONA INJETÁVEL SOBRE OS PARÂMETROS MORFOFUNCIONAIS DO CORPO LÚTEO DE VACAS LACTANTES E ACÍCLICAS SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE IATF

INFLUENCE OF PRE-SYNCHRONIZATION WITH INJECTABLE PROGESTERONE ON THE MORPHOFUNCTIONAL PARAMETERS OF THE CORPUS LUTEUM OF LACTATING AND ACYCLIC COWS UNDERGOING AN FTAI PROGRAM

Raquel Gomes do AMARAL¹; Maria Antônia Moreira MACIEL¹; Wendel Denian Silva SANTOS¹; Artur Azevedo MENEZES²; Daniel Bispo FERREIRA; Horácio Matheus Gomes ALENCAR³; Antonio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Alexandra Soares RODRIGUES¹

¹Centro Multidisciplinar do *Campus* da Barra. Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil.

²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMEVZ), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

³*Campus* de Patos, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PE, Brasil.

*E-mail: raquel.a4378@ufob.edu.br

Abstract

The present study evaluated the effect of pre-synchronization with injectable progesterone (P4i) on the luteal parameters of acyclic and lactating Nelore females submitted to a program for Fixed Time Artificial Insemination (FTAI). For this, 34 lactating bovine females (*Bos taurus indicus*), belonging to the pluriparous category, body condition score (BCS) between 2.5 and 2.75, evaluated using a scale from 1 to 5, were used. In random day called -10 (D-10), females were divided into two treatments: Group P4i (n=18) - 150mg of long-acting injectable progesterone was administered intramuscularly (IM) - and Control group (n =16) - 1mL of saline solution was applied, then pre-synchronization was performed. On day zero (D0), an intravaginal device containing 1.0 g of progesterone was inserted and 2.0 mg of estradiol benzoate IM was applied. On day eight (D8) of the protocol, intravaginal progesterone devices were removed and 12.5 mg of dinoprost tromethamine IM, 300 IU of equine chorionic gonadotropin and 1 mg of estradiol cypionate IM were applied. On day 10 (D10) of the synchronization protocol, AIs were performed using cryopreserved semen marketed from a single Nelore bull. The evaluation of the corpus luteum (CL) was performed by B-mode ultrasound and color Doppler on day 23 (D23), measuring the diameter of the CL (LCD), the total area of the CL (ACL), area of vascularization of the CL (LCV) and percentage of vascularization in the CL area (%VCL). Thus, the means for DCL, ACL, LCV and %LCV were, respectively, 1.73 ± 0.29 cm, 2.12 ± 0.47 cm², 0.83 ± 0.28 cm² and $38.95 \pm 10.24\%$ for the control group and 1.68 ± 0.22 cm, 2.08 ± 0.55 cm², 0.83 ± 0.36 cm² and $41.28 \pm 16.71\%$ for the P4i group, no with significant differences between the groups observed. Thus, from the results obtained, it was concluded that pre-synchronization with injectable progesterone ten days before the start of a protocol for FTAI did not improve the development of luteal morphofunctional characteristics of Nelore, lactating and acyclic cows under the conditions of this present work.

Keywords: Artificial insemination, acyclic, pre-synchronization, progesterone, corpus luteum.



Introdução

Buscando a superação do anestro pós-parto, desencadeado pelo modelo de criação majoritariamente extensivo evidenciado no Brasil, favorecendo a ocorrência de baixo ECC nas fêmeas, novos tratamentos hormonais dentro dos protocolos para inseminação artificial estão sendo desenvolvidos e, dentre eles, Sales *et al.* (2019) citam a pré-exposição à progesterona (P4) injetável anteriormente a um protocolo para IATF como alternativa para indução ao retorno da ciclicidade no período pós-parto.

Este protocolo se mostrou eficiente em elevar a taxa de concepção de vacas lactantes, acíclicas e com baixo ECC, além de promover um melhor desenvolvimento das características foliculares em estudos anteriores (SIMÕES *et al.*, 2018; SIMÕES *et al.*, 2019). Herzog *et al.* (2011) e Tarso *et al.* (2017) relacionaram, em seus trabalhos, a elevada dimensão e vascularização dos folículos ovulatórios com a adequada formação e funcionalidade do corpo lúteo subsequente e menores taxas de perdas embrionárias.

No entanto, existem poucos estudos relatados que analisam a aplicação de uma dose de progesterona injetável dez dias antes do início do protocolo de sincronização para a IATF sobre as características morfofuncionais do CL.

Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da pré-sincronização com P4 injetável sobre os parâmetros morfofuncionais do corpo lúteo de fêmeas Nelore lactantes submetidas a um programa para IATF.

Materiais e Métodos

Local e Animais:

O experimento foi realizado entre os meses de agosto de 2021 até julho de 2022 no município de Barra, região Oeste da Bahia. Utilizou-se 34 fêmeas da raça Nelore lactantes com em média 50 a 60 dias pós-parto, pertencentes à categoria plurípara, escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 a 2,75, avaliadas utilizando-se a escala de 1 a 5. Foram consideradas aptas para o experimento apenas as vacas com ausência de anormalidades no trato reprodutivo e com ausência de corpo lúteo mediante exame clínico-ginecológico e ultrassonográfico previamente ao início do tratamento para sincronização. Todos os animais usados neste experimento receberam vacinação contra doenças da esfera reprodutiva e obedecem ao calendário oficial estadual de vacinação. Os animais foram manipulados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais



(CEUA) e o estudo aprovado pelo Comitê de Ética Local Animal da Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), BA, Brasil, sob protocolo número 002/2018.

Protocolo de Sincronização:

As fêmeas foram submetidas a um protocolo sincronização que se iniciou em um dia aleatório denominado como dia -10 (D-10). Neste momento, os animais foram divididos em dois tratamentos: Grupo P4i (n=18) – se administrou 150mg de progesterona injetável de longa ação por via intramuscular IM e Grupo controle (n=16) - foi realizado a aplicação 1 mL de solução fisiológica IM. No dia zero (D0), foi feita a inserção de um dispositivo intravaginal contendo 1,0 g de progesterona, associado à aplicação de 2,0 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular IM. No dia oito (D8) foi realizado a remoção dos dispositivos intravaginais de progesterona, os animais receberam 12,5mg de dinoprost trometamina IM, 300 UI de gonadotrofina coriônica equina e se aplicou 1 mg de cipionato de estradiol IM. A IATF foi realizada no dia 10 (D10) do protocolo de sincronização utilizando sêmen criopreservado de um único touro da raça Nelore.

Avaliações Ultrassonográficas:

Os parâmetros luteais foram determinados por meio da avaliação do corpo lúteo (CL) por ultrassonografia modo B e Doppler colorido no dia 23 (D23) do protocolo de sincronização. As imagens luteais armazenadas foram submetidas a avaliação objetiva, onde se calculou a área total do CL em cada animal, empregando uma função do próprio aparelho. Para o cálculo da área de vascularização se utilizou o cursor para verificar a VCL. Para determinação do percentual de vascularização na área do CL (%VCL) foi realizada a razão entre a área de vascularização e área total do CL.

Procedimentos Estatísticos:

Os dados foram processados usando o *Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 19) considerando um nível de significância de 5%. A média e desvio-padrão das variáveis de interesse ao estudo foram obtidas por meio da análise descritiva e as distinções entre as médias de DCL, ACL, VCL e %VCL nos tratamentos foram comparados por meio do teste t de Student.

Resultados e Discussão



No presente trabalho, obteve-se para os grupos Controle e Progesterona Injetável (P4i), respectivamente, médias para o DCL de $1,73 \pm 0,29$ cm e $1,68 \pm 0,22$ cm, da ACL de $2,12 \pm 0,47$ cm² e $2,08 \pm 0,55$ cm², da VCL igual a $0,83 \pm 0,28$ cm² e $0,83 \pm 0,36$ cm² e para a %VCL de $38,95 \pm 10,24$ cm e $41,28 \pm 16,71$ cm, não sendo observada diferença significativa entre os dados dos diferentes grupos (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão (S) do diâmetro luteal (DCL), da área total do CL (ACL), da área de vascularização do CL (VCL) e do percentual de vascularização na área do CL (%VCL) de fêmeas bovinas Nelore submetidas a injeção de progesterona (P4i) ou não 10 dias antes de iniciar um Programa para Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

Grupos experimentais	Nº de Animais	DCL Média±S (cm)	ACL Média±S (cm ²)	VCL Média±S (cm ²)	%VCL Média±S (%)
CONTROLE	16	$1,73 \pm 0,29$	$2,12 \pm 0,47$	$0,83 \pm 0,28$	$38,95 \pm 10,24$
P4i	18	$1,68 \pm 0,22$	$2,08 \pm 0,55$	$0,83 \pm 0,36$	$41,28 \pm 16,71$
TOTAL	34	$1,71 \pm 0,26$	$2,10 \pm 0,51$	$0,83 \pm 0,32$	$40,11 \pm 13,48$

Concordando com os resultados encontrados do presente estudo, Carôso et al. (2022) relataram em trabalho avaliando os parâmetros reprodutivos de fêmeas Nelore submetidas ou não a pré-sincronização em protocolos para TETF, médias para os grupos controle e P4i, respectivamente, de $2,62 \pm 0,87$ cm² e $2,66 \pm 0,87$ cm² para a ACL e de $1,82 \pm 0,32$ cm e $1,86 \pm 0,34$ cm para o DCL. Além disto, a área de vascularização das fêmeas avaliadas, como os resultados supracitados, não demonstrou diferença significativa entre os grupos avaliados e, desta forma, os autores concluíram que a pré-exposição à progesterona não melhorou as características morfofuncionais do corpo lúteo em receptoras zebuínas.

Os estudos realizados por Simões et al. (2018), com vacas Nelore lactantes, submetidas a um protocolo de pré-sincronização com progesterona injetável e avaliadas 14 dias após a IATF não observaram melhoria nos parâmetros luteais após o tratamento. Corroborando com esses achados, Silva et al. (2018) trabalhando com vacas leiteiras mestiças submetidas a pré-sincronização com um



dispositivo intravaginal de progesterona dez dias antes do início de um protocolo para IATF, também não relataram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

Foi evidenciado, em estudo desenvolvido por Sá Filho (2007), uma predisposição das fêmeas acíclicas apresentarem ciclo curto quando exposta a tratamentos de curta duração com dispositivos de progesterona. Desta forma, hipotetizou-se que a pré-sincronização com progesterona injetável em fêmeas acíclicas, permitiria que os animais tratados tivessem a formação do CL com características morfofuncionais superiores aos animais não submetidos ao tratamento, devido à sensibilização hipotalâmica, superando a ocorrência do ciclo curto.

No entanto, os achados do presente estudo, em consonância com trabalhos anteriores, demonstraram que as fêmeas tratadas com a pré-sincronização não esboçam distinções nas dimensões e vascularização luteal, sugerindo que a pré-exposição à progesterona injetável pode permitir uma superação do ciclo curto, porém sem afetar os parâmetros luteais.

Conclusão

Concluiu-se que a administração de progesterona injetável dez dias antes do início do protocolo de sincronização não afetou as características morfofuncionais do corpo lúteo de vacas Nelore lactantes e acíclicas.

Referências

CARÔSO, B. S. S. **Exposição à progesterona antes do início do protocolo de sincronização da ovulação para TETF em receptoras zebuínas.** 2022. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia, p. 50.

HERZOG, K.; VOSS, B.; KASTELIC, J. P.; BEINDORFFA, N.; PAUL, V.; NIEMANNB, H.; BOLLWEIN, H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. 2011. **Theriogenology**, v.75, p. 549 –554.

SÁ FILHO, O. G. de. **Efeito de tratamentos com progesterona e/ou estradiol na incidência de regressão prematura do corpo lúteo após a primeira ovulação em vacas nelore pós-parto.** 2007. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista.

SILVA, L.A.C.L.; SIMÕES, L.M.S.; BOTTINO, M.P.; SANTOS, A.P.C.; SANTOS, G.; MARTINEZ, I.Y.H.; SOUZA, J.C.; BARUSELLI, P.S.; SALES, J.N.S. Presynchronization by induction of a largest follicle using a progesterone device in GnRH-based-ovulation



synchronization protocol in crossbred dairy cows. 2018. **Theriogenology**, doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.04.030.

SIMÕES, L. M. S.; LIMA, E. A.; MARTINEZ, M. B. P.; ZANATTA, G. M.; MASSONETO, J. P. M.; SANTOS, M; F. O. dos; MACHADO, A. B.; DIAS, M. M.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G. de; BASTOS, M. R.; SALES, J. N. S. Progesterone pre-exposition to ovulation synchronization protocol increases follicular diameter and pregnancy rate in *Bos taurus* and *Bos indicus* suckled beef cows. 2019. **Animal Reproduction**, v.16.

SIMÕES, L. M. S.; ORLANDI, R. E.; MASSONETO, J. P. N.; SCANDIUZZI JR, L. A.; FREITAS, B. G.; BASTOS, M. R.; SOUZA, J. C.; SALES, J. N. S. Exposure to progesterone previous to the protocol of ovulation synchronization increases the follicular diameter and the fertility of suckled *Bos indicus* cows. 2018. **Theriogenology**, v. 166, p. 28-33.

TARSO, S. G. S.; GASTAL, G. D. A.; BASHIR, S. T.; GASTAL, M. O.; APGAR, G. A.; GASTAL, E. L. Follicle vascularity coordinates corpus luteum blood flow and progesterone production. 2017. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p. 448–457.



INFLUÊNCIA DA SEGUNDA COLOSTRAGEM NAS MEDIDAS BIOMÉTRICAS E PESO DE BEZERROS DA RAÇA GIROLANDO

INFLUENCE OF SECOND COLOSTRAGE ON BIOMETRIC MEASUREMENTS AND WEIGHT IN GIROLANDO CALVES

Hugo Andrey Santos dos SANTOS¹; Camille Gabriela Ramos PORTAL¹; Maria Eduarda Soares da SILVA¹; Samille Alexandre RODRIGUES¹; Luciara Celi Chaves DAHER¹; Waldjânio de Oliveira MELO²; Bruno Moura MONTEIRO¹; Rinaldo Batista VIANA¹

¹Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Paragominas, Pará, Brasil;

*E-mail: hugosaantos03@gmail.com;

Abstract

Raising calves, especially in the initial phase, is challenging, until the animal can adapt to the environment after colostrum ingestion, since failure to transfer passive immunity can affect the animal's performance, especially growth. Biometric measurements and weight are important to track calf development. Therefore, the present study aimed to evaluate the influence of the second colostrum on the biometric measurements and weight of calves. The study was carried out on a farm located in the municipality of Paragominas, from December 2021 to July 2022, where 80 calves were evaluated, 28 males and 52 females, of the Girolando breed. For the colostrum of the calves, a volume of 10% of the body weight at birth was supplied, within two hours after birth, with a Brix degree equal to 25%. When this percentage was not reached, the thawed colostrum was enriched with artificial colostrum powder, as determined by the manufacturer, until it reached a brix equal to 25%. A cattle weighing tape was used to determine weight, height at the withers, croup width and chest circumference. No significant differences were observed in treatment effects and the interaction between time and treatment. The use of biometric measurements can infer how productive the animal can become, due to the relationship between height at the withers and the animal's weight. The second colostrum does not affect the weight development of calves.

Keywords: Dairy farming; measuring tape; weight performance

Introdução

A pecuária leiteira apresenta ampla importância no panorama econômico do Brasil, pois engloba a cadeia produtiva e o setor comercial de alimentos. Uma das etapas de grande importância nessa pecuária é uma boa execução na criação de bezerros, atenção ao manejo, nutrição e instalações, que são fatores importantes para o desenvolvimento de animais saudáveis (AZEVEDO *et al.*, 2022).

Na fase inicial da vida os bezerros são desafiados pelo ambiente constantemente, tudo isso enquanto seu organismo tenta se adaptar e depende ainda inteiramente de defesas adquiridas pela ingestão de colostro, que é composto por imunoglobulinas, hormônios e nutrientes essenciais,



determinantes para a manutenção da saúde e desempenho futuro desses animais (BITTAR, 2016; TEIXEIRA *et al.*, 2017).

A falha de transferência de imunidade passiva está associada a baixas taxas de crescimento, aumento da morbidade e mortalidade, aumento do risco de descarte e diminuição da produção de leite na primeira lactação (TYLER *et al.*, 1999). Além disso, consequências como a diminuição no ganho do peso médio diário, sobrevivência, saúde e a produtividade futura das novilhas leiteiras (MCGUIRK; COLLINS, 2004; LESLIE; PEREGRINE, 2008).

As medidas biométricas e o peso são primordiais para acompanhar o desenvolvimento do bezerro, além disso, o perímetro torácico é considerado a variável que melhor representa a estimativa do peso corpóreo, podendo-se então avaliar a dieta, nutrição e sanidade, de maneira análoga a estes parâmetros (DANTAS, 2017).

Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar a influência da segunda colostragem nas medidas biométricas e peso de bezerros da raça girolando criados no trópico úmido amazônico.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Paragominas, pertencente à mesorregião do sudeste paraense, no período de dezembro de 2021 a julho de 2022.

Foram avaliados 80 bezerros, da raça Girolando, sendo 28 machos e 52 fêmeas, elegidos em delineamento inteiramente casualizado, alocados em dois grupos: 1) manejo convencional (n = 40, 1 colostragem) e 2) - dupla colostragem (n = 40), mantidos em bezerreiro tipo tropical. Somente foram incluídos no estudo, bezerros nascidos de partos eutócicos monitorizados, separados de suas mães, tempestivamente, após o nascimento. Os animais eram acompanhados diariamente, desde o nascimento até os 60 dias de idade.

Os animais eram colostrados utilizando-se colostro descongelado em banho-maria, à temperatura de 35 a 40°C, com grau Brix igual a 25%, ofertados em um volume de 10% do peso corpóreo nas primeiras duas horas pós-nascimento. Para a segunda colostragem, 5% do peso corpóreo em colostro era ofertado ao bezerro em até no máximo 18 horas após o nascimento. Quando o colostro descongelado não atingia esse percentual, era enriquecido com colostro artificial em pó, consoante determinação do fabricante até atingir Brix igual a 25°Bx. Para o fornecimento do colostro eram utilizadas mamadeiras, e quando o animal não ingeria espontaneamente, era utilizado uma sonda esofágica para auxiliar na total ingestão.



Os animais foram avaliados desde o nascimento até os 60 dias de idade, utilizando uma fita métrica de pesagem de bovinos, para determinar o peso (kg), bem como a altura da cernelha (cm), largura da garupa (cm) e perímetro torácico (cm). Durante os 60 dias, foram determinados dias específicos para obtenção desses valores, sendo estes ao nascimento (0h), 24h (1d), 48h (2d), 7d, 15d, 30d, 45d e 60d. As medidas foram analisadas utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (version 9.4, SAS Institute Inc.; Cary, NC).

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 é possível observar que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) nos efeitos de tratamento e da interação entre tempo e tratamento.

Tabela 1 - Medidas biométricas e peso de dois grupos de bezerros conforme os protocolos de colostragem.

Variáveis	Manejo Convencional		Dupla Colostragem		Tempo	P value	
	Média	EPM	Média	EPM		Tratamento	Tem * Trat
Número de animais	32		28				
Altura da Cernelha, cm	79,62	0,50	79,56	0,58	< 0,0001	0,76	0,91
Largura da garupa, cm	21,20	0,26	20,64	0,26	< 0,0001	0,18	0,89
Perímetro torácico, cm	82,64	0,71	82,06	0,77	< 0,0001	0,69	0,84
Peso, Kg	51,78	1,35	50,54	1,44	< 0,0001	0,43	0,99

O presente estudo corrobora com os achados de Zheng e Yepes (2021) que avaliaram a eficiência da segunda colostragem administrada em até 24 horas de vida do animal, e apesar de observarem aumento nos níveis de proteína sérica, não observaram diferença significativa no crescimento e nos índices de ganho de peso médio diário dos bezerros. Assim como para o estudo de Silva *et al.* (2020), que também obtiveram resultados semelhantes ao fornecerem diferentes quantidades de colostro natural e/ou substituto de colostro.

A mensuração biométrica é uma característica de grande importância, tendo em vista seu auxílio no acompanhamento do crescimento dos animais, pois a partir do desenvolvimento dos bezerros, utilizando tais medidas, pode-se atentar no quão produtivo o animal pode se tornar, principalmente devido a relação existente entre essas medidas, mesmo que possam estar em ascensão, tendo em vista que a associação entre altura da cernelha e o peso, principalmente, pode



determinar que o animal não apenas apresentou crescimento, como também ganho de peso (CUE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2021).

Conclusão

Bezerros colostrados duas vezes não obtêm maiores medidas biométricas e peso, possivelmente porque a segunda colostragem não afeta o desenvolvimento ponderal dos animais.

Referências

AZEVEDO, R. A.; TEIXEIRA, A. D. M.; BITTAR, C.; FERREIRA, G.; ZAMBRANO, J.; SANTOS, J.; ... GOMES, V. **Padrão Ouro de Criação de bezerras e novilhas leiteiras**. Uberaba: Alta Genetics, 2 ed., 37 p., 2022.

BITTAR, C.M.M. Instalações para bezerras leiteiras. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. 81 ed., 107 p., 2016.

CUE, R. I.; PIETERSMA, D.; LEFEBVRE, D.; LACROIX, R.; WADE, K.; PELLERIN, D.; RUSHEN, J. Growth modeling of dairy heifers in Québec based on random regression. **Canadian Journal of Animal Science**, v.92, n.1, 33-47, 2012.

DANTAS, A.; OLIVEIRA, R. A.; CARREGA, M. F. C. S.; DE RUEDIGER, F. R.; DE CASTILHO, A. M.; OBA, E. Efeito do plano nutricional sobre as medidas biométricas de cordeiras durante a fase de crescimento. In **Colloquium Agrariae**. v. 12, n. 2, p. 12-18, 2016.

LESLIE, K. E.; PEREGRINE, A. S. Passive Immunity in Ontario Dairy Calves and Investigation of Its Association with Calf Management Practices. **Journal** 10: 3840-273 3849, 2008.

RAETH, M.; PAS, H. J.; ZIEGLER, D.; ZIEGLER, B.; SCHIMEK, D.; COOK, D. L.; GOLOMBESKI, G.; GROVE, PAS, A. V. Pre- and postweaning performance and health of dairy calves fed milk replacers with differing protein sources. **Research**, v.32, n. 6, p.833-841, 2016.

SILVA, A. L.; DEVRIES, T. J.; FERNANDES, E. C.; MARCONDES, M. I. Development and evaluation of equations to predict growth of Holstein dairy heifers in a tropical climate. **Journal of Dairy Science**, v.104, n.1, p.525-531, 2021.

SILVA, A. P.; DE TOLEDO, A. F.; CEZAR, A. M.; COELHO, M. G.; JÚNIOR, G. F. V.; POCZYNEK, M.; ... BITTAR, C. M. M. Passive transfer and neonatal health in dairy calves receiving maternal colostrum and/or a colostrum replacer. **Livestock Science**, v.240, 2020.

TEIXEIRA, V. A.; NETO, H. C. D.; COELHO, S. G. Efeitos do colostro na transferência de imunidade passiva, saúde e vida futura de bezerras leiteiras. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.14, n.5, p.7046- 7052, 2017.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

TYLER, J. W.; HANCOCK, D. D.; THORNE, J. G.; GAY, C. C.; GAY, J. M. Partitioning the mortality risk 301 associated with inadequate passive transfer of colostral immunoglobulins in dairy calves. **Journal VetIntern Medicine**. v.13, p.335–337, 1999.

VAN SOEST, B.; CULLENS, F.; VANDEHAAR, M. J.; M. WEBER NIELSEN, M. Short communication: Effects of transition milk and milk replacer supplemented with colostrum replacer on growth and health of dairy calves. **Journal Dairy Science**. n.103, p.12104–12108, 2020.

ZHENG, Q. D.; YEPES, F. A. L. Effects of Receiving Two Initial Feedings of Colostrum on the Average Daily Gain and Health of Pre-Weaning Group Housed Holstein Heifer Calves. **Animals**, v.11, n.11, 2021.



INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DA FORMA DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE CATETOS (*Pecari tajacu*)

INFLUENCE OF TEMPERATURE AND STORAGE WAY ON THE QUALITY OF PECCARY (*Pecari tajacu*) CHILLED SEMEN

Romário Parente dos SANTOS^{1*}; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Samara Sandy Jerônimo MOREIRA¹; Yasmin Carla da Silva CAVALCANTE¹; Ana Glória PEREIRA; Tayná Moura MATOS¹; Yuri Gonçalves MATOS¹; Alexandre Rodrigues SILVA¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil;
*e-mail: romario.parente@hotmail.com

Abstract

The objective was to evaluate the effects of different refrigeration systems with different temperatures in the preservation of the quality of collared peccary sperm parameters. Ejaculates from 08 individuals were obtained by electroejaculation and diluted in Tris-egg yolk. Samples were stored in a biological oxygen demand incubator (BOD) at 17 °C or in a commercial transport container (Botutainer) at 5 °C. The following sperm parameters were studied: total and progressive motility evaluated by a computer-aided system, viability and mitochondrial activity analyzed by using fluorescent probes and osmotic response as verified through a hypoosmotic assay. Significant differences were found between the results at time intervals of 24 (viability - 78.6 ± 2.1 ; $61.75 \pm 1.5\%$ and mitochondrial activity - 83.0 ± 2.5 ; $63.75 \pm 1.3\%$) and 48 hours (osmotic response - 80.25 ± 2.3 ; $61.5 \pm 5.3\%$) between the TAINER system and the BOD, respectively ($P < 0.05$). The Botainer refrigeration system at 5 °C provided more adequate maintenance of sperm parameters related to viability, mitochondrial activity and osmotic response up to 48 hours.

Keywords: taiassuids, botutainer, artificial insemination, conservation

Introdução

O cateto (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758 é um ungulado da família Tayassuidae, presente nas Américas, desde o sudeste dos Estados Unidos ao sul do Brasil (MARTINS; PONTES, 2020). Graças a sua grande importância social na fauna nativa, sucederam-se diversos esforços para o desenvolvimento de protocolos para a criopreservação do seu material genético (SOUZA *et al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2019), porém o desenvolvimento de protocolos de refrigeração do sêmen é ainda incipiente. Na verdade, tais protocolos já foram testados para a espécie, mas apenas possibilitaram a manutenção das amostras de sêmen por 36 horas, quando armazenadas em sistema de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 5 °C após diluição em Tris acrescido de gema de ovo ($45,5 \pm 9,0$) ou Aloe vera ($40,2 \pm 17,2$) a 20% (SOUZA *et al.*, 2016).



No intuito de se expandir o período de armazenamento do sêmen, propõe-se avaliar os efeitos de diferentes sistemas de refrigeração com distintas temperaturas na preservação da qualidade dos parâmetros espermáticos do sêmen de catetos.

Material e métodos

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFERSA (Parecer nº 12/2022). Ejaculados de oito machos adultos, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil), foram obtidos por eletroejaculação sob anestesia com propofol (5 mg/Kg IV) em bolus (CASTELO *et al.*, 2010). Foram avaliados os parâmetros espermáticos de motilidade total e progressiva (análise computadorizada), atividade mitocondrial e viabilidade espermática (incubação em sondas fluorescentes, seguida da avaliação em microscópio de epifluorescência) e resposta osmótica (teste hipo-osmótico (HOS)).

Foram comparados dois sistemas de refrigeração: uma incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD, Quimis, São Paulo, Brasil) a 5 °C, e um container comercial de transporte de sêmen (TAINER – Botutainer®, Botupharma, Botucatu, Brasil) a 17 °C, respeitando-se as curvas de refrigeração preconizadas para cada dispositivo. O sêmen foi diluído em extensor à base de Tris + gema de ovo (20%), preconizando a concentração final de 100 x 10⁶ de espermatozoides / mL. As frações diluídas foram acondicionadas em BOD seguindo as recomendações de Souza et al. (2016). Para o Botutainer, as amostras foram acondicionadas em um recipiente próprio do contêiner de transporte contendo água.

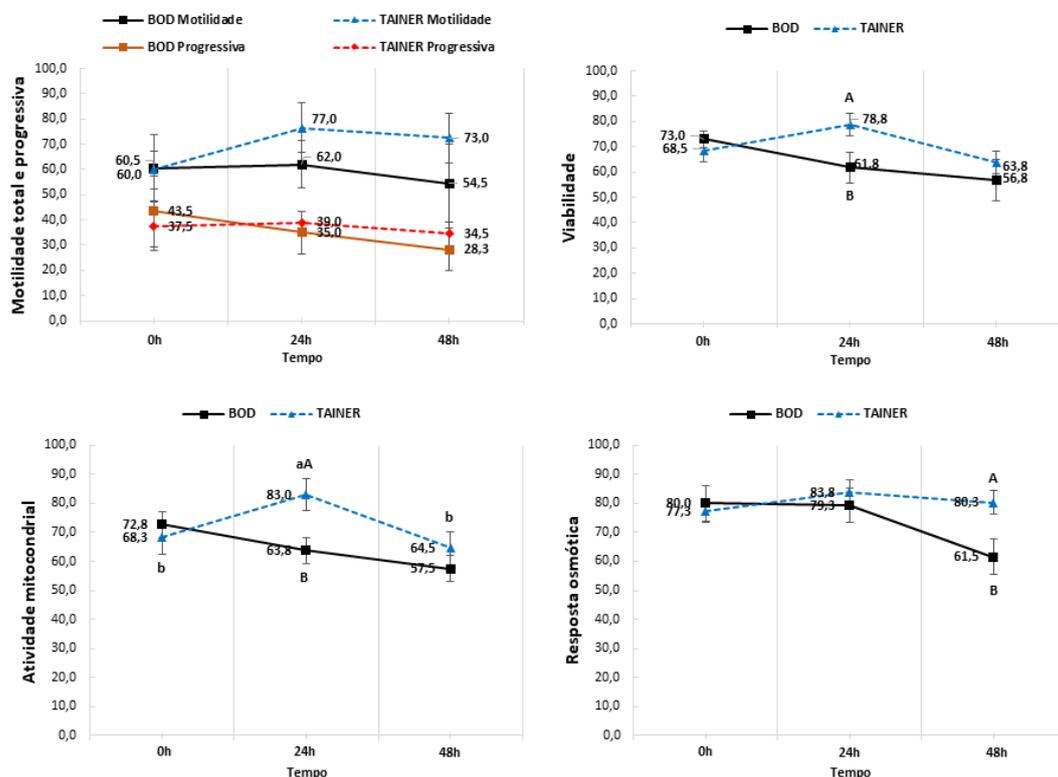
Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média. A influência do tempo de incubação (0, 24 e 48) e o sistema de refrigeração sobre os parâmetros espermáticos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas no tempo (GLM REP). Todas as análises foram realizadas usando programa IBM SPSS Statistics (Versão 21.0. Armonk, NY: IBM Corp) com P < 0,05.

Resultados e Discussão

Os ejaculados frescos apresentaram valores médios de 89,0 ± 2,4 % de motilidade total, 63,7 ± 5,8% de motilidade progressiva, 73,1 ± 4,5% de viabilidade, 73,2 ± 4,4 de atividade mitocondrial e resposta osmótica de 93,7 ± 1,9%. Não houve nenhuma interação significativa para os aspectos

de motilidade total e progressiva. Contudo, é notável que durante os tempos (0, 24 e 48 horas), foram encontradas diferenças significativas entre as amostras diluídas em relação aos parâmetros de viabilidade, atividade mitocondrial e resposta osmótica ($P < 0,05$). As diferenças para determinados parâmetros ocorreram tanto em âmbito de respostas medidas no tempo, como também em relação aos tipos de sistemas de refrigeração (Figura. 1, $P < 0,05$).

Figura 1 - Valores (médios \pm erro padrão da média) para motilidade total, progressiva, viabilidade, atividade mitocondrial e resposta osmótica em sêmen refrigerado de catetos (*Pecari tajacu*) diluído em Tris + gema de ovo (20%) e acondicionados em BOD 17 °C (n = 4) e Botutainer 5 °C (n = 4) por até 48h. Letras maiúsculas (^{A,B}) em sobrescrito indicam que houve diferença significativa para o tipo de sistema de refrigeração utilizado ao longo do tempo. Letras minúsculas (_{a,b}) indicam diferença significativa para as medidas repetidas entre os intervalos de tempo (0, 24 e 48). Significância de 5% ($P < 0,05$).



O sistema TAINER proporcionou a preservação máxima da viabilidade das células espermáticas durante o intervalo de 24h, em relação a BOD e garantiu a manutenção dessa viabilidade deste o início até as 48h, onde voltou a se equiparar com o sistema BOD. Curvas de refrigeração mais lentas têm sido associadas a melhor preservação da viabilidade e fertilidade do



sêmen em espécies domésticas (DHAMI *et al.*, 1992). A este respeito, taxas de refrigeração mais rápidas têm sido associadas a danos irreversíveis (DROBNIS *et al.*, 1993).

A atividade mitocondrial no sistema TAINER, garantiu o mesmo comportamento que apresentou a viabilidade espermática, onde no intervalo de 24 horas de avaliação, é possível notar a superioridade desse sistema para o parâmetro supracitado em relação a BOD. Contudo, nesse caso específico foi verificadas oscilações lineares tanto em relação ao aumento de atividade mitocondrial (0 para 24h), como também redução linear acentuada desse aspecto (24 para 48h), que determinou diferenças em relação aos tempos avaliados. Por fim, para a resposta osmótica a BOD apresentou diminuição acentuada da integridade funcional dos espermatozoides no intervalo de 48 horas, quando comparado com o sistema TAINER.

Na literatura, existem evidências de que o sistema Botutainer, seguindo uma curva de refrigeração lenta garante nas horas iniciais menor probabilidade de exposição das células espermáticas ao choque térmico (FARRÁS *et al.*, 2008). Em equinos, o Equitainer e o Botutainer, apresentaram o mesmo comportamento de eficiência no que diz respeito a manutenção da motilidade total e integridade de membrana plasmática durante armazenamento por até 24 horas em temperaturas de 24 e 40 °C, respectivamente (AVANZI *et al.*, 2006). Os resultados alcançados para os catetos seguem um padrão de resposta similar aos encontrados nas demais espécies submetidas a refrigeração em Botutainer.

Conclusão

Em conclusão, ambos os sistemas apresentaram resultados satisfatórios. Contudo, o sistema de refrigeração por meio da utilização do contêiner de transporte (Botutainer) a 5 °C proporcionou de forma mais adequada a manutenção dos parâmetros espermáticos relacionados a viabilidade, atividade mitocondrial e resposta osmótica até 48 horas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



Referências

- AVANZI, B. R.; FARRÁS, M. C.; MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA, J. A.; MEDEIROS, A. S. L.; ARAÚJO, G. H. M.; PAPA, F. O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v.94, n. 1-4, p.152–154, 2006.
- BEZERRA, L. G. P.; SOUZA, A. L. P.; LAGO, A. E. A.; CAMPOS, L. B.; NUNES, T. L.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Addition of Equex STM to Extender Improves Post-Thawing Longevity of Collared Peccaries' Sperm. **Biopreservation and Biobanking**, v.17, n.2, p.143-147, 2019.
- CASTELO, T. S.; BEZERRA, F. S. B.; SOUZA, A. L. P.; MOREIRA, M. A. P.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Influence of the thawing rate on the cryopreservation of semen from collared peccaries (*Tayassu tajacu*) using Tris based extenders. **Theriogenology**, v. 74, n.6, p.1060-1065, 2010.
- DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G. Effect of various cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of Bos Taurus and Bos Bubalis semen. **Theriogenology**, v.38, n.3, p.565–574, 1992.
- DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v.265, n.4, p.432-437, 1993.
- FARRÁS, M. C.; AVANZI, B. R.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen eqüino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.693–699, 2008.
- MARTINS, R. A. A.; PONTES, J. A. L. Registro da ocorrência de *Pecari tajacu* (Linnaeus, 1758), uma espécie que era declarada extinta no município do Rio de Janeiro, estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. **Boletim da sociedade brasileira de mastozoologia**, v.88, p.58-61, 2020.
- SOUZA, A. L. P.; LIMA, G. L.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. M.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. **Theriogenology**, v.85, n.8, p.1432-1438, 2016.



ISOLAMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DE CÉLULAS SOMÁTICAS DERIVADAS DE TECIDO SOMÁTICO DE PREÁS (*Galea spixii* WAGLER, 1831)

ISOLATION AND *IN VITRO* CULTURE OF SOMATIC CELLS DERIVED FROM SOMATIC TISSUE OF SPIX'S YELLOW-TOOTHED CAVY (*Galea spixii* WAGLER, 1831)

Leonardo Vitorino Costa de AQUINO^{1*}; Samara Lima OLINDO¹; Yasmin Beatriz França MOURA¹; Yara Letícia Frutuoso e SILVA¹; Ana Livia Rocha RODRIGUES¹; Vinicius Dantas da SILVA¹; Moacir Franco de OLIVEIRA²; Alexsandra Fernandes PEREIRA¹

¹Laboratório de Biotecnologia Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

²Centro de Multiplicação de Animais Silvestres, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil.

* leonardovt@live.com

Resumo

O estabelecimento do cultivo *in vitro* de células a partir de fragmentos de pele tem sido proposto como uma técnica útil na conservação das espécies, especialmente quando associada à clonagem por transferência nuclear. Pertencente à ordem Rodentia, *G. spixii* se destaca como uma das espécies mais estudadas em virtude de seu papel ecológico, econômico e científico, uma vez que podem ser utilizadas em estudos para a conservação de roedores ameaçados de extinção. Portanto, o objetivo foi descrever o cultivo *in vitro* de células somáticas oriundas da pele de *G. spixii*, usando o ensaio de viabilidade celular por azul de tripan e atividade metabólica pelo ensaio de brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio ou MTT. Para tanto, biópsias de pele da região auricular periférica foram recuperadas de quatro machos adultos anestesiados. As amostras foram transportadas por 1 h em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de solução de penicilina e estreptomicina, a 37°C. No laboratório, fragmentos (9,0 mm³) foram cultivados em atmosfera controlada (38,5°C, 5% de CO₂) e avaliados a cada 24 h. Após as células atingirem 70% de confluência, foi realizado o primeiro subcultivo celular para obtenção da concentração desejada (5,0 × 10⁴ células/mL) para o ensaio de MTT. Além deste, um pool de células tripsinizadas foram avaliadas quanto à viabilidade com azul de tripan. Todos os dados obtidos foram expressos como média ± erro padrão. Quanto ao ensaio de azul de tripan, foi obtida uma viabilidade de 93,8% ± 0,4. Já no ensaio de MTT foi obtido o percentual de 100% ± 6,2 de atividade metabólica. Em conclusão, biópsias da região auricular periférica de *G. spixii* permitiram o isolamento de células viáveis e com alta funcionalidade metabólica, fornecendo uma valiosa fonte celular para a transferência nuclear de célula somática.

Palavras-chave: Cavídeos, conservação, recursos somáticos, cultivo celular.

Abstract

The establishment of *in vitro* cell culture from skin fragments has been proposed as a useful technique in species conservation, especially when associated with cloning by nuclear transfer. Belonging to the order Rodentia, *G. spixii* stands out as one of the most studied species due to its ecological, economic and scientific role, since it can be used in studies for the conservation of endangered rodents. Therefore, the aim was to describe the *in vitro* culture of somatic cells from the skin of *G. spixii*, using the trypan blue cell viability assay and metabolic activity by 3-4,5-



dimethyl-thiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide or MTT assay. Then, skin biopsies from the peripheral ear region were retrieved from four anesthetized adult males. Samples were transported for 1 h in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 2% penicillin and streptomycin solution at 37°C. In the laboratory, fragments (9.0 mm³) were cultured in a controlled atmosphere (38.5°C, 5% CO₂) and evaluated every 24 h. After the cells reached 70% confluence, the first cell subculture was performed to obtain the desired concentration (5.0 × 10⁴ cells/mL) for the MTT assay. In addition to this, a pool of trypsinized cells were evaluated for viability with trypan blue. All data obtained were expressed as mean ± standard error. As for the trypan blue assay, a viability of 93.8% ± 0.4 was obtained. In the MTT assay, the percentage of 100% ± 6.2 of metabolic activity was obtained. In conclusion, biopsies from the peripheral ear region of *G. spixii* allowed the isolation of viable cells with high metabolic functionality, providing a valuable cellular source for somatic cell nuclear transfer.

Keywords: Cavids, conservation, somatic resources, cell culture.

Introdução

A ordem Rodentia é constituída por mais de 2000 roedores de pequeno a grande porte, e destes, o *G. spixii*, pertencente à família dos cavídeos, se destaca como uma das espécies mais estudadas em virtude de seu papel ecológico e econômico. Além disso, o *G. spixii* possui relevância científica, pois tem sido utilizado como modelo experimental para outros roedores ameaçados de extinção (SILVA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a formação de bancos de tecidos somáticos se destaca como uma ferramenta interessante na conservação do *G. spixii* (TUNSTALL *et al.*, 2018), uma vez que é possível empregar esses tecidos somáticos no cultivo *in vitro*, permitindo a recuperação de células que podem ser utilizadas em estudos relacionados a reprogramação nuclear por clonagem (PRAXEDES *et al.*, 2021) e indução de células à pluripotência para produção de gametas (TOYOOKA *et al.*, 2003). Portanto, o objetivo foi descrever o cultivo *in vitro* de células somáticas oriundas da pele de *G. spixii*, visando a formação de bancos de células para futuras biotecnologias.

Material e métodos

O experimento foi realizado em concordância com o Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA/UFERSA no. 23091.010566/2017-20), bem como pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, no. 60428-1). Um total de quatro espécimes de *G. spixii* machos adultos foi utilizado, provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS/UFERSA).



Para as biópsias de pele, os animais foram anestesiados conforme descrito por PEREIRA *et al.* (2021). Após a confirmação do plano anestésico, biópsias do pavilhão auricular periférico com o auxílio de tesoura cirúrgica foram recuperadas. Em seguida, as amostras foram transportadas ao laboratório em meio essencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de solução de antibióticos-antimicóticos por 1 h a 37°C. No laboratório, as amostras foram tricotomizadas, fragmentadas em 9,0 mm³ e distribuídas aleatoriamente nas placas de cultivo.

Para o cultivo celular, fragmentos foram lavados em DMEM¹⁰ (10% de antibióticos-antimicóticos), álcool e DMEM² (2% de solução de antibióticos-antimicóticos) (PRAXEDES *et al.*, 2021). Em seguida, foram encaminhados ao cultivo *in vitro*, onde permaneceram na incubadora em atmosfera úmida de 5% de CO₂, a 38,5°C. Diariamente, trocas de meios foram realizadas sob fluxo laminar e microscópio invertido. Após as células atingirem 70% de confluência, foi realizada a tripsinização e as células foram submetidas as análises de viabilidade e atividade metabólica.

Para avaliação da viabilidade celular, uma alíquota de células (20 µL) foi obtida e corada com 0,4% de azul de tripan, onde células viáveis foram as incolores, enquanto as não-viáveis foram as coradas em azuis (PRAXEDES *et al.*, 2021). Na atividade metabólica, o ensaio por brometo de (3- 572 (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi empregado. Brevemente, células foram cultivadas durante 5 dias na concentração 5,0 × 10⁴ células/mL. Após o período, uma solução de MTT foi adicionada, e após 3 h foi realizado a análise das células somáticas a 595 nm (PRAXEDES *et al.*, 2021).

Finalmente, os dados foram expressos de forma descritiva, considerando a média ± erro padrão dos quatros indivíduos.

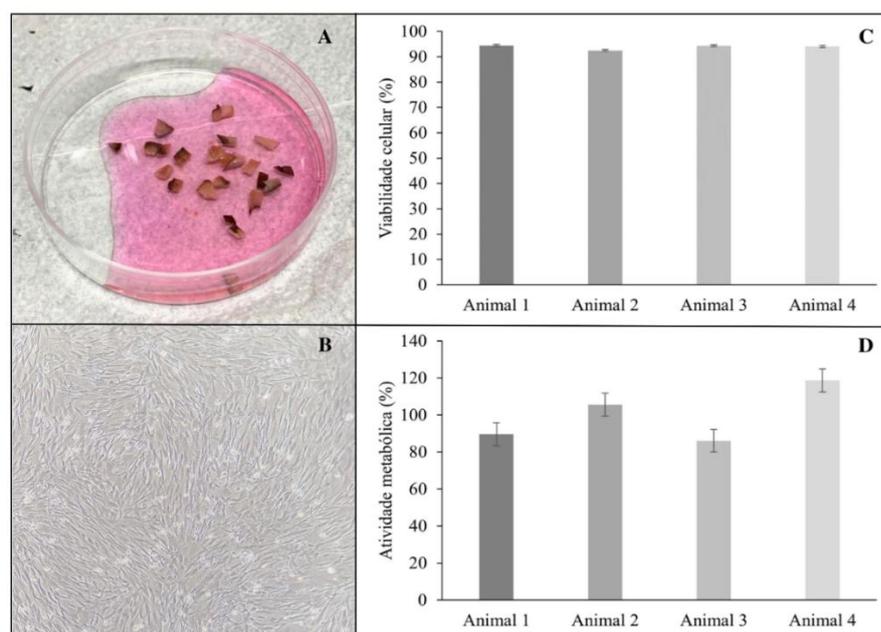
Resultados e discussão

O tempo de cultivo total foi de 23 dias para as amostras derivadas de todos os indivíduos. Dos dezesseis fragmentos submetidos ao cultivo (quatro fragmentos por animal, Fig. 1A) todos apresentaram aderência no segundo dia com crescimento celular ao redor dos explantes a partir do nono dia (6,0 ± 0,0). As células atingiram 70% de confluência formando monocamada no dia 20 ± 0,0. Em geral, a partir da análise morfológica, todas as células apresentaram morfologia fusiforme com núcleo oval centralizado, mostrando-se semelhante a fibroblastos (Fig. 1B).

Quanto ao ensaio de azul de tripan, foi obtida uma viabilidade de $93,8\% \pm 0,4$ [Animal 1, $94,41\% \pm 0,4$; Animal 2, $92,48\% \pm 0,4$; Animal 3, $94,33\% \pm 0,4$; Animal 4, $94,02\% \pm 0,4$ (Fig. 1C)]. Já no ensaio de MTT foi obtido o percentual de $100\% \pm 6,2$ de atividade metabólica [Animal 1, $89,6\% \pm 6,2$; Animal 2, $105,6\% \pm 6,2$; Animal 3, $86,1\% \pm 6,2$; Animal 4, $118,7\% \pm 6,2$] (Fig. 1D)].

Esses resultados foram similares quando comparado a outras espécies de roedores, como o porquinho-da-índia (MEHRABANI *et al.*, 2014), hamster (MEHRABANI *et al.*, 2016) e *Dasyprocta leporina* (PRAXEDES *et al.*, 2021), e demonstraram que células em condições de cultivo adequada são interessantes para estudos relacionados a biologia celular e molecular, podendo auxiliar ainda na conservação da espécie por meio do seu emprego em biotecnologias reprodutivas.

Figura 1 - Avaliação das condições de cultivo *in vitro* no estabelecimento do cultivo primário de células somáticas de *G. spixii*. **(A)** Amostras tricotomizadas e fragmentadas em $9,0 \text{ mm}^3$. **(B)** Células derivadas do cultivo primário, apresentando aspecto fusiforme. **(C)** Avaliação da viabilidade usando azul de tripan em células do cultivo primário. **(D)** Avaliação do metabolismo celular usando o ensaio de MTT.



Conclusão

As biópsias da região auricular periférica de *G. spixii* permitiram o isolamento de células viáveis com alta funcionalidade metabólica, fornecendo uma valiosa fonte celular para a transferência nuclear de célula somática, visando à conservação desta espécie.



Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, Código Financeiro 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, no. 309078/2021-0).

Referências

- MEHRABANI, D; BOOYASH, N; AQABABA, H; TAMADON, A; ZARE, S; DIANATPOUR, M. Growth kinetics, plasticity and characterization of hamster embryonic fibroblast cells. **Italian Journal of Zoology**, v. 83, p. 306–311, 2016.
- MEHRABANI, D; MAHBOOBI, R; DIANATPOUR, M; ZARE, S; TAMADON, A; HOSSEINI, S.E. Establishment, culture, and characterization of guinea pig fetal fibroblast cell. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, p. 510328, 2014.
- PEREIRA, A.F; AQUINO, L.V.C; NASCIMENTO, M.B; BEZERRA, F.V.F; BORGES, A.A; PRAXEDES, E.A; OLIVEIRA, M.F. Ultrastructural and morphometric description of the ear skin and cartilage of two South American wild histricognato rodents (*Dasyprocta leporine* and *Galea spixii*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 41, p. e06775, 2021.
- PRAXEDES, E.A; SILVA, M.B; OLIVEIRA, L.R.M; VIANA, J.V.S; SILVA, A.R; OLIVEIRA, M.F; PEREIRA, A.F. Establishment, characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758)–A study in a wild rodent. **Cryobiology**, v. 98, p. 63–72, 2021.
- SILVA, A.R; PEREIRA, A.F; LIMA, G.L; PEIXOTO, G.C.X; SOUZA, A.L.P. **Assisted Reproductive Techniques on South American Wild Mammals**. IntechOpen, 2016.
- TOYOOKA, Y; TSUNEKAWA, N; AKASU, R; NOCE, T. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. v. 100, p. 11457–11462, 2003.
- TUNSTALL, T; KOCK, R; VAHALA, J; DIEKHANS, M; FIDDES, I; ARMSTRONG, J; PATEN, B; RYDER, O.A; STEINER, C.C. Evaluating recovery potential of the northern with rhinoceros from cryopreserved somatic cells. **Genome Research**, v. 28, p. 780–788, 2018.



OCORRÊNCIA DE DIARRÉIAS EM BEZERROS DA RAÇA GIROLANDO CRIADOS NO TRÓPICO ÚMIDO AMAZÔNICO

OCCURRENCE OF DIARRHEA IN GIROLANDO CALVES RAISED IN THE AMAZON HUMID TROPIC

Kevin Luigi Azevedo de VASCONCELOS¹; Allana Lais Alves LIMA¹; Gisella Lucia Alves RAMOS¹; Helena Carneiro RIBEIRO¹; Luciara Celi Chaves DAHER¹; Waldjânio de Oliveira MELO²; Bruno Moura MONTEIRO¹; Rinaldo Batista VIANA¹

¹Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Paragominas, Pará, Brasil.

E-mail: kevinluigi2016@gmail.com

Abstract

Diarrhea is one of the main causes of morbidity and mortality in calves. The aim of the present study was to evaluate the incidence of diarrhea in Girolando calves raised in the Amazon humid tropic. The research was carried out on a farm located in the municipality of Paragominas, from December 2021 to July 2022, where 80 calves (males and females) of the Girolando breed were evaluated. The animals were monitored daily and the health rounds were executed three times a week, any change in the animal's health status was identified and the animal treated and monitored until the condition became stable. For the colostrum, a volume of 10% of the birth body weight was supplied within two hours after birth, containing a Brix degree equal to 25%. When this percentage was not reached, the thawed colostrum was enriched with artificial colostrum powder, as determined by the manufacturer. In the present study, a 37.5% (30/80) incidence of animals with non-specific diarrhea was presented, that is above the values considered national gold standard for the creation of calves, in which the acceptable morbidity rate recommended for diarrhea is less than 25% in the lactation phase. Perhaps these values are related to the type of management in the creation of the animals, kept in argentine or tropical calf farms, which did not permit adequate hygiene of the facilities, since the floor of the calf was covered with boulders. Prophylaxis, control and biosecurity measures need to be implemented on the farm to reduce diarrhea's occurrence.

Keywords: Colostrum, diseases, immunity, management

Introdução

Os índices de morbidade e mortalidade variam de acordo com o sistema de criação, assim como o agente causador e também a capacidade de resposta do organismo. Sabe-se que os principais agentes infecciosos envolvidos na síndrome da diarreia em neonatos são os vírus (rotavírus e coronavírus), bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Clostridium perfringens*) além de protozoários (*Eimeria* sp.). Nos casos de origem não infecciosa, as causas principais são compreendidas pelos erros de manejo alimentar e higiênicos, que quando solucionados podem



reduzir significativamente mortes e posteriores gastos com tratamentos de bezerros enfermos (BOTTEON *et al.*, 2008).

A adoção de medidas profiláticas é de fundamental importância para que diminua a frequência das enfermidades nos animais em uma propriedade, que podem ser acometidos desde o período neonatal até a fase adulta. Porém, ainda existe certa resistência dos produtores devido aos gastos onerosos com demandas no manejo nutricional e higiênico sanitário do local (RADOSTITS *et al.*, 2007). Da mesma forma, o tratamento é de extrema relevância, pois a diarreia pode acarretar o surgimento de outras enfermidades, além do desenvolvimento tardio do bezerro (HEATH *et al.*, 2007). A questão sanitária requer grande atenção em relação ao manejo de neonatos. Diante disso, objetivou-se com o presente estudo, avaliar a ocorrência de diarreias em bezerros da raça girolando criados no trópico úmido amazônico.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido em uma fazenda localizada no município de Paragominas, pertencente à mesorregião do sudeste paraense, no período de dezembro de 2021 a julho de 2022.

Foram avaliados 80 bezerros, da raça Girolando, sendo 28 machos e 52 fêmeas, elegidos em delineamento inteiramente casualizado, alocados em dois grupos: 1) manejo convencional (n = 40, 1 colostragem) e 2) dupla colostragem (n = 40), mantidos em bezerreiro tipo tropical. Somente foram incluídos no estudo, bezerros nascidos de partos eutócicos monitorizados, separados de suas mães, tempestivamente, após o nascimento. Os animais eram acompanhados diariamente, desde o nascimento até os 60 dias de idade.

Os animais eram colostrados utilizando-se colostro descongelado em banho-maria, à temperatura de 35 a 40 °C, com grau Brix igual a 25 °Bx, ofertados em um volume de 10% do peso corpóreo nas primeiras duas horas pós-nascimento. Para a segunda colostragem, 5% do peso corpóreo em colostro eram ofertados aos bezerros em até no máximo 18 horas após o nascimento. Quando o colostro descongelado não atingia esse percentual, era enriquecido com colostro artificial em pó, consoante determinação do fabricante até atingir 25 °Bx. Para o fornecimento do colostro eram utilizadas mamadeiras, e quando o animal não ingeria espontaneamente, era utilizado uma sonda esofágica para auxiliar na total ingestão.

Os animais eram acompanhados diariamente, durante o aleitamento e nas rondas sanitárias diárias, onde quaisquer alterações no estado de saúde do animal, como apatia, alterações nas fezes,



febre e prostração eram identificadas para o diagnóstico definitivo do quadro clínico. A partir disso, foram conferidos os dados obtidos em planilhas no Microsoft Excel, dos animais que apresentaram quadros de diarreia, durante o período da ronda sanitária.

Resultados e Discussão

A tabela 1 mostra a incidência de diarreia durante o período de desenvolvimento do projeto (0 a 60 dias) com os 80 bezerros avaliados.

Tabela 1- Quantificação de bezerros com diarreia no período de 0 a 60 dias de vida.

Status Sanitário	Quantidade
Diarreia	30
Outras enfermidades	30
Sadios	20
Total	80

Diante dos resultados obtidos, foi possível verificar que os bezerros acometidos com diarreia representaram 37,5% dos animais, valor considerado elevado em comparação com as informações de referência do Padrão Ouro de criação de bezerras e novilhas leiteiras (AZEVEDO, 2022), que preconiza valores abaixo de 25%. As altas taxas de mortalidade nos bezerros são maiores quando existem animais acometidos de diarreia (FURMAN, 2011).

A falha na transferência de imunidade passiva (FTIP) é uma das responsáveis pela alta mortalidade em bezerros leiteiros (WINDEYER *et al.*, 2014). Falhas no aleitamento podem ocasionar disfunções na digestão dos animais e agravamento dos quadros de diarreia, seja pela escolha inadequada do colostro, como também, por problemas sanitários nos locais onde estão alojados (MADUREIRA, 1999).

As medidas de higiene dos materiais utilizados para a colostragem e aleitamento dos bezerros neonatos, não são suficientes para assegurar o controle de microorganismos patogênicos (BOTTEON *et al.*, 2008), além de que o tipo de sistema de criação, assim como as possíveis práticas preventivas para a enfermidade, sendo estas realizadas de maneira incorreta, também são



considerados fatores para o crescimento dos casos de diarreia nos bezerros (OLIVEIRA *et al.*, 2020; POMIM *et al.*, 2021).

Conclusão

Diante do estudo, sabemos que a diarreia neonatal afeta diretamente a produtividade nas propriedades leiteiras. Sendo assim, é de fundamental importância a implementação de medidas de profilaxia, controle e biossegurança nos bezerreiros. Dessa forma, temos a redução de casos de diarreia nos animais, a diminuição perdas econômicas e a promoção da saúde do rebanho.

Referências

AZEVEDO, R. A.; TEIXEIRA, A. D. M.; BITTAR, C.; FERREIRA, G.; ZAMBRANO, J.; SANTOS, J.; ... GOMES, V. **Padrão Ouro de Criação de bezerras e novilhas leiteiras**. Uberaba: Alta Genetics, 2 ed., 37 p., 2022.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biossecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North American: Food Animal Practice**, v.18, n. 1, p. 7-34, 2002.

BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L.; JÚNIOR, J. C. B. S.; PINNA, M. H.; LÓSS, Z. G. Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paraíba Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Revista Brasileira de Pesquisa Veterinária e Zootecnia**, v. 45, n. 2, pág. 153, 1 abr. 2008.

FURMAN-FRATCZAK, K.; RZASA, A.; STEFANIAK, T. The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves serum on their health and growth. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 11, p. 5536-5543, 2011.

HEATH, S. E.; NAYLOR, J. M.; GUEDO, B. L.; PETRIE, L.; ROUSSEAU, C. G.; RADOSTITS, O. M. The effects of feeding milk to diarrheic calves supplemented with oral electrolytes. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.53, n.4, p.477, 1989.
MADUREIRA, L. D. Diarréia de bezerros. **Embrapa Gado de Corte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1999.

OLIVEIRA, K. D. R.; VIEIRA, R. P. F. C.; DE ALBUQUERQUE CERQUEIRA, L.; DA SILVA BARBOSA, F. P.; DA SILVA, A. C. A.; CRUZ, R. K. S.; PIMENTEL, M. M. L. As interfaces da diarreia neonatal na espécie bovina: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal: RBHSA**, v.14, n.3, p.1-14, 2020.

POMIM, G. P.; DE SOUZA NEVES, P. M.; SILVA, R. A. B.; DA SILVA GARCIA, M.; CARVALHO, G. F.; MELO, A. F.; FRIAS, D. F. R. Perfil do conhecimento de produtores sobre diarreia neonatal bovina e seu impacto para a atividade. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.15, n.3, 1-11, 2021.



XI CONGRESSO
NORTE E NORDESTE
DE REPRODUÇÃO
ANIMAL

17 a 19 de novembro de 2022

ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL

RADOSTTTS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary Medicine –a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses.** 10.ed. Edinburgh: Saunders. 2007. p.127-160; 896-920.

WINDEYER, M. C., K. E. LESLIE, S. M. GODDEN, D. C. HODGINS, K. D. LISSEMORE, E S. J. LEBLANC. 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Prev. Vet. Med.** 113:231–240.



PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE BÚFALOS DO NASCIMENTO AOS 18 MESES DE IDADE NA REGIÃO DA AMAZÔNIA ORIENTAL

PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF BUFFALO FROM BIRTH TO 18 MONTHS OF AGE IN THE EASTERN AMAZON REGION

Renata Gonzaga COSTA¹; Anderson Silva COELHO²; Bruno Moura MONTEIRO²; José Dantas Ribeiro FILHO³; Raysa Brenda Marques MAIA⁴; Damazio Campos de SOUZA¹; João Lucas da Graça Andrade COSTA¹; Rinaldo Batista VIANA¹

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia/Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Veterinária/Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária, FMVZ/Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil.

Abstract

In the buffalo species, most of the work is carried out on animals that are affected by some disease. The present work aims to determine the physiological parameters, referring to heart rate (HR), respiratory rate (RR), rectal temperature (RT) and ruminal movements (RM) of buffalo calves from birth to weaning in the eastern Amazon region. Reference ranges of physiological parameters of buffalo calves from birth to weaning were found in the eastern Amazon region.

Keywords: calf, buffalo, heart rate.

Introdução

Em diversos estados brasileiros, os bubalinos têm se tornado uma boa opção econômica, principalmente pela exploração leiteira e pela consequente exploração do queijo mozzarella, um produto de ótima aceitação pelo mercado, comercializado a altos preços, em virtude da baixa oferta (TONHATI, 2002). Apesar da semelhança fenotípica e morfológica com os bovinos, e de acreditar-se que estejam sujeitos às mesmas doenças, estudos genéticos comprovam que os búfalos estão mais próximos dos ovinos e caprinos do que dos próprios bovinos (MATTAPALLIL; ALI 1999).

Na espécie bubalina grande parte dos trabalhos são realizados em animais que estão acometidos por alguma enfermidade. Os trabalhos para estabelecer intervalos de referência ainda são escassos (PÖPISIL *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 2010a; GOMES *et al.*, 2010b), especialmente no bioma Amazônico, havendo a necessidade da criação de intervalos de referência próprios ou validação dos já disponíveis na literatura. Assim sendo, o presente trabalho visa determinar os parâmetros fisiológicos, referentes a frequência cardíaca (FC), respiratória (FR), temperatura retal



(TR) e movimentos ruminais (MR) de bezerros bubalinos do nascimento ao desmame na região da Amazônia Oriental.

Material e Métodos

Caracterização do local:

O estudo foi realizado no Biotério Unidade Bubalinocultura Leiteira Eva Daher Abufaiad, pertencente ao Instituto da Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia, *campus* Belém, estado do Pará. Segundo a classificação de KöppenGeiger (2006), o clima no município é classificado como Af, apresentando um índice pluviométrico significativo ao longo do ano, com média anual de 2537mm, sendo os meses de novembro e março os momentos de menor (89 mm) e maior (380 mm) pluviosidade, respectivamente, além de uma temperatura média de 26,8°C (INMET, 2019).

Delineamento experimental:

Foram utilizados 24 animais neonatos da espécie bubalina, mestiços da raça Murrah x Mediterrâneo, sendo 12 machos e 12 fêmeas. Todos os bezerros permaneceram com suas mães no decorrer do experimento, até os 18 meses de idade. Os bezerros foram clinicamente examinados, sendo elegíveis para o estudo aqueles cujos parâmetros fisiológicos encontravam-se compatíveis com intervalos de referência, em avaliação clínica. Os parâmetros avaliados para a inclusão ou não dos animais no experimento foram: alerta, vigor, temperatura retal (>38° e <39,5°C), frequência cardíaca (>80 e <120 bpm), frequência respiratória (>40 e <60 mpm), coloração de mucosas (branca, rosa ou vermelha) e tempo de enchimento capilar (<3 segundos). Os animais foram testados periodicamente quanto à verminose gastrointestinal, por meio de OPG e coproculturas e vermifugados, de acordo com o protocolo estabelecido no Biotério Unidade de Bubalinocultura Leiteira Eva Daher Abufaiad, que consistiu em vermifugação dos bezerros ao nascer seguida de vermifugações estratégicas baseadas nos resultados de OPG. Foram aferidos periodicamente os parâmetros fisiológicos: frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm); frequência respiratória (FR), em movimentos por minuto (mpm); temperatura retal (TR), e movimentos ruminais (MR), em movimentos ruminais por minuto (mrpm).



Análise estatística:

A estatística descritiva foi representada pela média aritmética e erro padrão da média (EPM) para as variáveis contínuas. Estes dados foram obtidos por meio do procedimento *Means* programa SAS, versão 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Foi utilizado o nível de significância de 5% para os testes.

Resultados e Discussão

Tabela 1 - Médias, erros-padrão das médias de parâmetros fisiológicos de bezerros bubalinos durante o período neonatal ($p < 0,5$).

Biomarcadores fisiológicos				
Idade/meses, dias	Freq. Card. (bpm) Média \pm epm	Freq. Resp (mpm) Média \pm epm	Temp. Retal (C°) Média \pm epm	Mov. Rumi. (mpm) Média \pm epm
0	112,52 \pm 2,74	46,78 \pm 4,03	38,58 \pm 0,12 ^a	0,0 \pm 0,0 ^c
7	110,62 \pm 3,63	48,81 \pm 2,86	38,55 \pm 0,09 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^c
14	100,0 \pm 4,25	50,65 \pm 4,20	38,67 \pm 0,07 ^a	0,0 \pm 0,0 ^c
21	97,86 \pm 3,00	43,43 \pm 2,28	38,60 \pm 0,10 ^a	0,0 \pm 0,0 ^c
28	82,14 \pm 5,32	41,33 \pm 4,55	38,52 \pm 0,08 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^c
2 meses/60	75,76 \pm 2,75	34,76 \pm 3,89	38,26 \pm 0,12 ^{bc}	0,0 \pm 0,0 ^c
3 meses/90	64,00 \pm 2,75	37,00 \pm 3,11	38,49 \pm 0,14 ^{ab}	0,06 \pm 0,06 ^e
4 meses/120	61,75 \pm 3,32	26,35 \pm 1,72	38,16 \pm 0,08 ^{cd}	0,70 \pm 0,21 ^d
5 meses/150	60,50 \pm 5,85	29,25 \pm 2,76	38,17 \pm 0,08 ^{cd}	1,10 \pm 0,25 ^{cd}
6 meses/180	55,89 \pm 2,84	25,37 \pm 1,17	38,02 \pm 0,09 ^{cde}	2,26 \pm 0,21 ^a
7 meses/210	51,13 \pm 2,05	22,44 \pm 1,74	37,86 \pm 0,13 ^{de}	1,94 \pm 0,25 ^{ab}
8 meses/240	46,64 \pm 4,01	22,50 \pm 1,23	37,89 \pm 0,11 ^{de}	2,07 \pm 0,30 ^a
9 meses/270	43,25 \pm 1,93	20,25 \pm 1,21	38,03 \pm 0,10 ^{cde}	2,58 \pm 0,23 ^a
10 meses/300	44,69 \pm 2,32	17,08 \pm 1,02	37,68 \pm 0,18 ^e	2,31 \pm 0,21 ^a
11 meses/330	44,0 \pm 3,53	21,0 \pm 2,48	38,07 \pm 0,09 ^{cd}	2,54 \pm 0,18 ^a
12 meses/360	42,45 \pm 2,95	20,0 \pm 1,31	37,89 \pm 0,14 ^{de}	2,36 \pm 0,28 ^a
13 meses/390	48,67 \pm 2,29	21,33 \pm 1,77	37,93 \pm 0,13 ^{cde}	2,33 \pm 0,24 ^a
14 meses/420	47,50 \pm 4,26	22,50 \pm 0,76	37,94 \pm 0,19 ^{cde}	2,13 \pm 0,40 ^{ab}
15 meses/450	52,27 \pm 2,30	20,82 \pm 1,61	37,75 \pm 0,18 ^{de}	2,55 \pm 0,28 ^a
16 meses/480	49,25 \pm 3,59	28,88 \pm 7,84	37,66 \pm 0,18 ^e	1,50 \pm 0,46 ^{bc}
17 meses/510	48,60 \pm 4,73	23,60 \pm 2,56	37,76 \pm 0,15 ^{de}	2,60 \pm 0,40 ^a



18 meses/540 49,26±2,62 25,37±3,65 37,90±0,13^{de} 2,47±0,16^a

Freq.Card.: Frequência cardíaca - Freq. Resp.: Frequência Respiratória - Temp. Reta.: Temperatura Retal – Mov. Rum.: Movimentos ruminais. Bpm: batimentos por minuto – Mpm: movimentos por minuto – C°: Grau Celsius

Os dados apresentados (Tabela 1) demonstraram que os valores médios de temperatura retal em machos e fêmeas bubalinas ao nascimento foram altos (38,58±0,12) se comparados aos meses seguintes até os 3 meses (38,49±0,14), pois a partir daí os valores médios de temperatura diminuíram gradativamente com o evoluir da idade, sendo os menores valores obtidos nos bezerros aos 10 meses de idade (37,68±0,18) e os mais elevados no grupo de animais com 14 dias de idade (38,67±0,07).

Os resultados não mostraram efeito significativo dos dias de vida sobre os parâmetros fisiológicos estudados (FC, FR e TR) durante a primeira semana de vida. No entanto, um efeito significativo dos dias de vida nos parâmetros vitais foi encontrado no período neonatal, como podemos observar na Tabela 1. Esses mesmos resultados se igualam ao trabalho de Piccione (2009), onde afirma que ao nascimento, a capacidade de manter a homeostase do calor é particularmente limitada e se baseia no grau de maturidade do organismo no momento do nascimento.

Após os 60 dias de vida, a FR se manteve variada, que de acordo com Quaterman e Broanbent (1974) e Souza *et al.* (1990), quando a temperatura ambiente se eleva, conseqüentemente o ritmo respiratório irá aumentar. Os bubalinos possuem baixa eficiência na perda de calor pelas vias cutâneas, com isso a perda de calor pelo ar expirado é mais importante do que pela transpiração (Barros *et al.*, 2015; Pantoja *et al.*, 2018).

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças significativas dos valores médios para TR no primeiro mês de vida. Com isso, durante o período neonatal a TR apresentou médias entre 38,52 e 38,67 °C, sem diferenças significativas registradas. Porém, Baccari Júnior (1990) relata que a idade tem influência sobre a temperatura retal de bovinos, pois, nos animais muito jovens a temperatura tende a ser mais alta, e a capacidade reguladora da mesma menor. Koga *et al.* (2004) diz que as interferências climáticas na temperatura retal dos bubalinos são inferiores, quando comparadas aos bovinos, devido à sua enorme capacidade em dissipar calor corporal, principalmente, por meio da via respiratória.

Após o período neonatal, verificou-se ainda a influência da faixa etária na frequência respiratória, cardíaca e movimentos ruminais (Tabela 1). Notou-se um declínio significativo nas médias de FC com o avançar da idade, mais precisamente entre os 120 dias aos 360 dias, entretanto,



a partir dos 390 dias foi observado um aumento gradativo nas médias da FC, provavelmente atribuídas ao manejo dos bezerros.

Já o MR demonstrou variação significativa após os 4 meses, que segundo Londoño *et al.* (2012) isso tem uma explicação fisiológica, pois o rúmen em animais jovens ainda está sendo preparado para adquirir todas as suas funções, ou seja, está em processo de transformação, quando este deixa de ser monogástrico e passa a um animal poligástrico, constatando que com o passar do tempo, a motilidade ruminal tende a aumentar, fato que pode ser devido ao crescimento dos animais.

Conclusão

A partir dos resultados apresentados, concluiu-se que a primeira semana de vida é marcada por modificações fisiológicas inerentes a adaptação das funções cardiorrespiratórias dos recém-nascidos, observando-se inicialmente uma estabilização da TR e do MR, no entanto, nos períodos subsequentes houve uma variação significativa da FC e FR, possivelmente atribuídas ao manejo dos bezerros. Estes dados demonstram impactos direto da relação do período de adaptação extrauterina nos parâmetros fisiológicos dos neonatos bubalinos com o potencial produtivo futuro dos mesmos.

Referências

BACCARI JÚNIOR, F. Métodos e técnicas de avaliação da adaptabilidade dos animais às condições tropicais. *In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BIOCLIMATOLOGIA*

ANIMAL NOS TRÓPICOS: PEQUENOS E GRANDES RUMINANTES, 1., 1990, Sobral, CE. **Anais... Sobral: Embrapa-CNPQ**, 1990. p. 9-17.

BARROS DV, SILVA LK, LOURENÇO JR JB, SILVA AO, SILVA AG, FRANCO IM. Evaluation of thermal comfort, physiological, hematological, and seminal features of buffalo bulls in an artificial insemination station in a tropical environment. **Trop Anim Health Prod.** 2015;47(5):805-13.

GOMES V., MADUREIRA K.M., BLAGITZ M.G., GALDINO J., VANTIM G. & BENESI F.J. 2010a. **Valores de referência e influência do etário sobre os parâmetros bioquímicos utilizados para avaliação da função hepática de bubalinos hígidos da raça Murrah.** *Ars Vet.* 26:128-131.



GOMES V., MOURA J.A., MADUREIRA M., BAPTISTELLA F., KITAMURA S.S., LAGITZ M.G. & BENESI F.J. 2010b. **Valores de referencia e influencia da idade no eritrograma de bubalinos da raça Murrah.** *Pesq. Vet. Bras.* 30:301-304.

INMET- Instituto Nacional de Meteorologia. Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa - BDMEP. Brasília, DF, Brasil. Disponível em:
<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>.<https://bdmep.inmet.gov.br>

KOGA, A.; SUGIYAMA, M.; DEL BARRIO, A.N.; LAPITAN, R.M.; ARENDA, B.R.; ROBLES, A.Y.; CRUZ, L.C.; KANAI, Y. Comparison of the thermoregulatory response of buffaloes and tropical cattle, using fluctuations in rectal temperature, skin temperature and haematocrit as an index. **Journal of Agricultural Science**, v.142, p.351-355, 2004.

LONDOÑO, Carolina; SÁNCHEZ, Erika Natalia; SANMIGUEL, Germán Alonso Prada. Parâmetros fisiológicos y valores hematológicos normales en búfalos (*Bubalus bubalis*) del Magdalena Medio colombiano. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 23, p. 51-64, 2012.

MATTAPALLIL M.J. & ALI S. 1999. **Analysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between water buffalo *Bubalus bubalis* and sheep *Ovis aries*.** *DNA Cell Biol.* 18:513-519.

PANTOJA, M. D. A., da Silva, J. A. R., Delgado, M. L., Margarido, Y. M. M., Adami, C. O. R., Garcia, A. R., & LOURENÇO JUNIOR, J. D. B. Respostas fisiológicas e adaptabilidade de bubalinos ao clima equatorial amazônico. **Embrapa Pecuária Sudeste-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2018.

PICCIONE, G.; CASELLA, S.; GIANNETTO, C.; VAZZANA, I.; NUTTA, P. P.; GIUDICE, E. Influences of age on profile of serum proteins in calf. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v.59, n.4, p.413-422, 2009. <https://doi.org/10.2298/AVB0904413P>.

QUATERMAIN, A. R.; BROANBENT, M. P. Some patterns of response to climate by the Zambian goat. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 40, p. 115-124, 1974.

SOUZA, B. B. et al. Comportamento fisiológico de ovinos deslanados no semi-árido expostos em ambiente de sol e em ambiente de sombra. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 2, p. 1-7, 1990.

TONHATI, H. **Crítérios de seleção para produção total de leite em bubalinos criados no estado de São Paulo, Brasil** Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2002. 68p. Tese (Livre Docência) - Universidade Estadual Paulista, 2002.



PREJUÍZOS NO BALANÇO REDOX DO TECIDO OVARIANO DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) PROVOCADOS PELO DECANOATO DE NANDROLONA

IMPAIRMENTS IN THE REDOX BALANCE OF THE OVARIAN TISSUE OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*) CAUSED BY NANDROLONE DECANOATE

João Eudes Farias CAVALCANTE FILHO¹; Ana Ruth Reinaldo MENEZES²; Alessandro Silva FERREIRA³; Solano Dantas MARTINS⁴; Yara Silvino SALES¹; Vânia Marilande CECCATTO⁶; Carminda Sandra Brito SALMITO-VANDERLEY⁶; Valdevane Rocha ARAÚJO⁵

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE/PPGCV).

²Universidade Estadual do Ceará (UECE/CCS).

³Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB).

⁴Universidade Federal do Ceará (UFC/PPGB).

⁵Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (UECE/PPGCF).

⁶Professora da Universidade Estadual do Ceará (UECE/CCS).

*E-mail: joao.eudes@aluno.uece.br

Abstract

The exacerbated use of anabolic androgenic steroids (AAS) cause damage to reproductive physiology, in addition to contributing to the deterioration of the environment, due to the large amount of chemical residues dumped in the aquatic environment. Thus, it is necessary to study the impact of these steroids on the reproduction of humans and animals. Among the animals used as study models to evaluate new compounds in different areas, such as health safety and reproduction, zebrafish can be highlighted. For this reason, the present work aimed to evaluate the effects of nandrolone decanoate on the redox balance metabolism in the ovarian tissue of zebrafish (*Danio rerio*) through the activity of superoxide dismutase (SOD) antioxidant enzymes. Forty zebrafish specimens were used. For exposure to nandrolone decanoate (DN), the aquarium level was lowered to 4 liters and animals remained there for 42 hours of exposure to the tested androgen. There were 7 (seven) exposures, during 7 (seven) weeks. At the end of the period, the animals were euthanized 42 hours after the last drug exposure. The ovaries were collected and destined for biochemical analysis. The results showed that animals exposed to the steroid showed a significant reduction ($P < 0.05$) in the antioxidant defense exerted by the activity of the SOD enzyme in the Deca group when compared to the Control group.

Keywords: Anabolic steroid, Exposure, Fish Reproduction.

Introdução

Esteróides anabólicos androgênicos (EAAs) são compostos sintéticos ou semissintéticos semelhantes à testosterona (ROCHA *et al.*, 2014).

A administração dos EAAs proporciona melhorias no condicionamento físico, e por esse motivo, observou-se um aumento do consumo por mulheres que o utilizam para fins estéticos, buscando o aumento de massa magra e redução de gordura subcutânea (POPE; KATZ, 2004). No



entanto, o uso exacerbado de EAAs ocasiona prejuízos na fisiologia reprodutiva em homens e mulheres (LIMA; CARDOSO, 2011; ROCHA *et al.*, 2014).

Em mulheres, o uso do EAAs pode ocasionar distúrbios no ciclo menstrual, oligomenorreia ou amenorreia e anovulação (CANNAVÒ *et al.*, 2001; ROGOL, 2010), além de atrofia dos seios, hipertrofia do clitóris e aumento da libido (HOFFMAN; RATAMESS, 2006; ROCHA *et al.*, 2014).

Dentre os EAAs mais conhecidos destaca-se o Decanoato de Nandrolona (DN), um dos anabolizantes mais utilizados do mundo, devido ao seu moderado potencial androgênico e boa propriedade anabólica, fornecendo a hipertrofia muscular (DUTRA; PAGANI; RAGNINI, 2012). Entretanto, são conhecidos diversos efeitos adversos em outros sistemas fisiológicos e a sua contribuição para a deterioração do meio ambiente, devido à grande quantidade de resíduos químicos despejados no meio aquático (LIMA; CARDOSO, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2016).

Na perspectiva de avaliar os possíveis danos ocasionados por esses resíduos químicos, o zebrafish (*Danio rerio*) vem se destacando como excelente modelo para estudos genéticos e toxicológicos em humanos (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KARI *et al.*, 2007; MARINOVIĆ *et al.*, 2019), em função de sua homologia (70%) genômica (MARINOVIĆ *et al.*, 2019) e de características como o pequeno porte, altas taxas reprodutivas, baixo valor econômico, fácil cultivo, transparência em seus embriões e rápido ganho de peso (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KARI *et al.*, 2007; MARINOVIĆ *et al.*, 2019).

Desse modo, é possível observar que a experimentação animal tem importante papel na ciência. Pois ainda que se procure reduzir, refinar e substituir por métodos alternativos que supram os testes *in vivo*, ainda se faz necessário o uso de modelos animais para o seu desenvolvimento, confiabilidade e legitimação da pesquisa científica.

Nesse sentido, podem-se realizar testes toxicológicos *in vivo* a fim de desvendar os efeitos do DN na fisiologia reprodutiva feminina, tendo em vista que, são poucas as pesquisas sobre a atuação dos EAAs nos órgãos reprodutivos, inclusive sobre os efeitos inflamatórios e oxidativos no tecido ovariano. No entanto, a utilização de material humano, além de ser escasso, traz uma série de questões éticas que dificulta a realização e inviabiliza esse estudo. Como alternativa, os pesquisadores têm realizado com sucesso testes toxicológicos preliminares em diferentes modelos animais, como o zebrafish (LANTZ-MCPEAK *et al.*, 2014).



Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos do decanoato de nandrolona sobre o metabolismo do balanço redox no tecido ovariano de zebrafish por meio da atividade da enzima antioxidante superóxido desmutase (SOD).

Material e métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais, CEUA da Universidade Estadual do Ceará, registrado sob o nº 03041520/2021 (UECE, CE, Brasil). Para tanto foram utilizadas 40 zebrafishes, adquiridos comercialmente que foram alojados em aquários (n=10) com capacidade total para 10 L, 20 fêmeas destinadas ao grupo controle e deca respectivamente, em condições de fotoperíodo de 14 horas de claro e 10 horas de escuro. Os peixes foram alimentados 1x por dia, tendo a água do aquário trocada parcialmente duas vezes na semana.

Protocolo experimental:

Para a exposição ao decanoato de nandrolona (DN), o nível do aquário foi descido para 4 litros e assim permaneceu por 42 h de exposição ao andrógeno testado. As fêmeas foram expostas a uma concentração de 10 mg/kg de DN diluído juntamente com álcool etílico (95°GL, 0,04%) e colocado na água e após as 42 h de exposição os animais retornaram para o aquário de origem, nos quais permaneceram até a próxima exposição. Foram realizadas 7 (sete) exposições, durante 7 (sete) semanas. Ao final do período, os animais foram eutanasiados após 42 h da última exposição ao fármaco. Os ovários foram coletados e destinados à análise bioquímica.

Atividades de enzimas antioxidantes (SOD):

A concentração de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e os valores da quantificação do conteúdo de proteínas totais foram utilizados para normalizar os dados de enzimas antioxidantes SOD (U/mg proteína). Cada 100 mg de tecido ovariano foi homogeneizado de 3 a 4x, por 10 seg à 4°C, em 900 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,9 % (p/v), pH 7.4), utilizando homogeneizador Ultra-turrax T25. As amostras foram centrifugadas por 10 min na velocidade de 720g G à 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio da atividade das enzimas da Superóxido Dismutase.

A quantificação da atividade da enzima antioxidante SOD foi analisada por meio da inibição da auto-oxidação da adrenalina. Os homogenados foram analisados em diferentes concentrações



de acordo com o tecido e a atividade detectada por espectrofotometria a 480 nm (BANNISTER; CALABRESE, 1987).

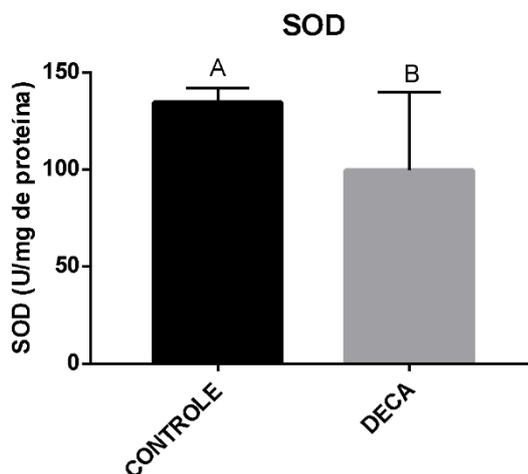
Análise estatística:

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação dos grupos foi utilizado a análise de variância (ANOVA) two-way. Foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e o post-hoc de Tukey. A significância estatística foi considerada quando os resultados apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese nula menor que 5% ($P < 0,05$). O software utilizado foi o GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

Resultados e discussão

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos grupos Controle e Deca é apresentada na Figura 1. Pode-se observar que animais expostos ao esteroide apresentam uma redução significativa ($P < 0,05$) na defesa antioxidante exercida pela atividade da enzima SOD no grupo Deca quando comparado ao grupo Controle.

Figura 1 - Efeito de 10 mg/kg de do decanoato de nandrolona (DECA) na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no ovário de zebrafish (*Danio rerio*). Grupo Controle e Deca.



^{A,B} Representa a diferença estatística observada entre os grupos ($P < 0,05$).

Os resultados do presente estudo, corroboram com os achados de Frankenfeld (2014) que observou a redução da atividade da SOD e a perturbação da homeostase REDOX em fígado, rim



e coração de animais tratados com 10 mg/kg de DN. Outros relatos apresentados na literatura apontam a capacidade dos esteroides sintéticos de desequilibrar o balanço entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e antioxidantes, resultando em um quadro de estresse oxidativo e consequente dano tecidual em diferentes órgãos tais como, fígado, rins, testículos e no sistema cardiovascular (PEY *et al.*, 2003; CHAVES *et al.*, 2006; TAHTAMONI *et al.*, 2010; RIEZZO *et al.*, 2014; POMARA *et al.*, 2015).

Conclusão

A administração crônica de decanoato de nandrolona (DN) promove alterações no sistema de defesa antioxidante, uma vez que reduz a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no tecido ovariano de zebrafish (*Danio rerio*). Por sua vez, tais resultados indicam estresse oxidativo e possíveis danos a este tecido. Contudo ainda são necessários mais estudos para elucidar o balanço redox e os possíveis impactos do DN no tecido ovariano.

Referências

- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of biochemical analysis**, v. 32, 279 – 312, 1987.
- BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CANNAVÒ, S.; CURTÒ, L.; TRIMARCHI, F. Exercise-related female reproductive dysfunction. **Journal Endocrinology Invest**, v. 24, n.10, p.823–832, 2001.
- DUTRA, B. S. C.; PAGANI, M. M.; RAGNINI, M. P. Esteróides anabolizantes – uma abordagem teórica. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.3, n. 2, p.21-39, 2012.
- HOFFMAN, J. R.; RATAMESS, N.A. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated?. **Journal of Sports Science and Medicine**. v. 5, p. 182- 193, 2006.
- IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. G. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 25, p. 773-782, 2009.
- KICMAN A.T. Farmacologia de esteroides anabolizantes. **British Journal of Pharmacol Ogy**. v. 104, p. 502-521, 2008.



LANTZ-MCPEAK et al. Developmental toxicity assay using high applied screening of zebrafish embryos. <https://doi.org/10.1002/jat.3029>. **Journal of applied toxicology**, 2014.

LIMA, A. P.; CARDOSO, F. B. Alterações fisiológicas e efeitos colaterais decorrentes da utilização de esteroides anabolizantes androgênicos. **Revista de Atenção à Saúde** (antiga Ver. Bras. Ciên. Saúde), v. 9, n. 29, 2012.

POPE, H. H. G Jr.; KATZ, D. L. Psychiatric and medical effects of anabolicandrogenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. **General Psychology**. V. 51, p. 375-382, 2004.

ROGOL, A. D. Drugs of abuse and the adolescent athlete. **Italian journal of pediatrics**, v. 36, n. 1, p. 1, 2010.

SHAHIDI, N. T. A review of chemistry, biological action, and clinical applications of 509 anabolic-androgenic steroids. **Clinical Therapeutics**. v. 23, p. 1355-1390, 2001.



TAMANHO DE NINHADA DE CADELAS ARTIFICIALMENTE INSEMINADAS COM BASE NA CITOLOGIA VAGINAL E DIFERENTES NÍVEIS DE PROGESTERONA SÉRICA

LITTER SIZE OF ARTIFICIALLY INSEMINATED BITCHES BASED ON VAGINAL CYTOLOGY AND DIFFERENT SERUM PROGESTERONE LEVELS

Eduardo de Oliveira COSTA^{1*}, Rodrigo F. BITTENCOURT¹, Isabella de Matos Brandão
CARNEIRO¹, Gleice Mendes XAVIER¹, Rodrigo Ribeiro Machado MENDES¹, Thamys
COSTA¹, Mateus Martins Rodrigues dos SANTOS¹, Elisiane Sateles dos SANTOS¹

¹Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Av. Adhemar de Barros, 500,
Salvador, Bahia, Brazil, 40170-110

Autor para correspondência:

Eduardo de Oliveira Costa

Rua Pedro Gama, 393, apt 206, Federação, Salvador, Bahia, Brasil, 40.231-015

Phone: +55 – 71-991603072

E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

Resumo

Buscou-se com o estudo determinar o efeito do momento da inseminação artificial em cadelas, de acordo com a citologia vaginal e dosagens de progesterona, sobre o tamanho da ninhada. As cadelas foram separadas nos seguintes grupos G1: fêmeas inseminadas em amplo período da fase estral, cuja dosagem de progesterona variou entre menos e mais que 15 ng/mL; G2: fêmeas inseminadas somente em período cuja progesterona foi menor que 15 ng/mL e G3: fêmeas Inseminadas somente em período cuja progesterona foi maior que 15 ng/mL. As fêmeas foram inseminadas quando o valor de células superficiais e queratinizadas (CSQ) na citologia vaginal foi igual ou superior a 70%. O sêmen foi colhido por manipulação digital e avaliado momentos antes a inseminação. A cada inseminação foi realizada a coleta de sangue para dosagem de progesterona sérica. O número de inseminações artificiais no G1 foi superior ($P < 0,05$). O número médio de filhotes por ninhada no estudo variou de $4,00 \pm 1,93$ a $5,38 \pm 1,8$, não havendo diferença estatística entre as médias dos grupos.

Palavras chaves: Estro, exames complementares, canino.

Abstract

The study sought to determine the effect of the timing of artificial insemination in bitches, according to vaginal cytology and progesterone dosages, on litter size. The bitches were separated into the following groups G1: females inseminated during a wide period of the estrous phase, whose progesterone dosage varied between less and more than 15 ng/mL; G2: females inseminated only in period whose progesterone was less than 15 ng/mL and G3: females inseminated only in period whose progesterone was greater than 15 ng/mL. Females were inseminated when the value of superficial and keratinized cells on vaginal cytology was equal to or greater than 70%. Semen was collected by digital manipulation and evaluated moments before insemination. At each insemination, blood was collected to measure serum progesterone. The number of artificial



inseminations in G1 was higher ($P < 0.05$). The mean number of pups per litter in the study ranged from 4.00 ± 1.93 to 5.38 ± 1.8 , with no statistical difference between the means of the groups.

Keywords: Estrus, complementary tests, dogs.

Introdução

A inseminação artificial (IA) objetiva a concepção da fêmea canina sem o contato diretamente com o macho. Esta biotecnologia é uma alternativa à monta natural, que consiste em depositar o sêmen do macho no trato reprodutivo da fêmea através da utilização de instrumentos auxiliares (SILVA *et al.*, 2003).

Para a IA ser empregada com sucesso em cadelas na rotina da clínica ou hospital veterinário é necessário que o profissional responsável entenda da fisiologia, endocrinologia e citologia vaginal da fêmea canina, pois o período de proestro é longo e pode confundir-se com o estro, dificultando a determinação do melhor momento para a inseminação (VERSTEGEN *et al.*, 2001; TSUTSUI *et al.*, 2009). Desta forma, o acompanhamento do estro da cadela precisa ser feito rotineiramente. Os aspectos comportamentais e fisiológicos devem ser observados e os exames complementares, como a citologia vaginal e dosagens de progesterona, precisam ser efetuados para determinar as fases do ciclo e o diagnóstico de desordens reprodutivas. Para realizar as correlações da progesterona sérica com o pico de LH e ovulação devem ser efetuadas as dosagens durante todo o acompanhamento do ciclo estral da fêmea canina a fim de se obter uma melhor taxa de concepção e tamanho de ninhada.

O objetivo com o estudo foi determinar a correlação do momento da realização da IA em cadelas com sua influência sobre o tamanho da ninhada, utilizando como ferramentas de monitoramento do ciclo estral da cadela a citologia vaginal e a dosagem de progesterona.

Material e métodos

Os animais utilizados neste estudo foram atendidos no Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia do Hospital Veterinário Renato de Medeiros Neto da Universidade Federal da Bahia em um intervalo de 22 meses. Foram atendidos 42 casais de cães, quatro fêmeas retornaram duas vezes, totalizando 46 acompanhamentos do ciclo estral com cães de diferentes raças e tamanhos.

Os animais submetidos ao programa passaram inicialmente por uma consulta clínica, na qual realizou-se a anamnese e avaliação física dos machos e das fêmeas. Além da análise clínica, as fêmeas foram submetidas aos seguintes exames complementares: hemograma completo, pesquisa



de brucelose com o método ELISA, citologia do epitélio vaginal a cada retorno e dosagem de progesterona em todos os regressos cujas fêmeas foram inseminadas. Para o macho: pesquisa de *Brucella canis* e espermograma completo de todos os ejaculados.

As fêmeas que apresentavam 70% ou mais de CSQ na análise da citológica vaginal, retornavam no dia seguinte para que se iniciassem as IAs.

Os animais foram acompanhados a cada dois dias, a partir da primeira IA, sempre com avaliação clínica, citologia vaginal e dosagem de progesterona da fêmea e avaliação clínica e espermograma completo do macho.

O sêmen foi colhido por estímulo digital e as amostras analisadas quanto aos aspectos de cinética (vigor, motilidade e motilidade progressiva), integridade de membrana por teste hiposmótico (Bittencourt *et al.*, 2005) e supravital, além da avaliação morfológica em lâmina corada, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

De acordo com os acompanhamentos clínicos e exames realizados, os animais foram separados em diferentes grupos: G1: fêmeas inseminadas em amplo período da fase estral, cuja dosagem de progesterona variou entre menos e mais que 15 ng/mL (n=23); G2: fêmeas inseminadas somente em período cuja progesterona foi menor que 15 ng/mL (n=12) e G3: fêmeas Inseminadas em período cuja progesterona foi maior que 15 ng/mL (n=11).

Após 30 dias da última inseminação, foram efetuadas a ultrassonografia para o diagnóstico de gestação. Neste momento, avaliou-se a viabilidade fetal e a estimativa da idade fetal, de acordo com as medidas: tamanho crânio-caudal e distância biparietal nos fetos. Posteriormente, os tutores de cada animal eram contatados para a obtenção de dados sobre data de parto, se o parto foi normal ou cirúrgico e tamanho da ninhada.

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS 9.1.3®). A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do Procedimento MEANS (PROC MEANS). Os dados de citologia vaginal, níveis de progesterona sérica e número de filhotes foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com suas médias sendo comparadas pelo teste de Tukey, com nível de probabilidade de cinco por cento.

Resultados e discussão

Os valores médios e seus desvios padrão, obtidos na citologia vaginal, dosagens de progesterona, e tamanho das ninhadas, podem ser observados na Tabela 1.



Tabela 1 - Teor de progesterona sérico de cadela agrupadas de acordo com o teor de progesterona sérico no momento da observação com citologia igual ou maior que 70%.

Item	Nº de Animais Inseminados nos grupos G1/ G2 e G3, respectivamente	Grupo experimental			Valor-P
		G1	G2	G3	
Citologia Vaginal (% de CSQ)					
1ª observação	22/11/10	75,13 ± 32,7	87,58 ± 12,41	83,09 ± 24,82	0,4072
2ª observação	22/11/9	85,87 ± 26,9	81,33 ± 31,67	85,11 ± 19,19	0,9090
3ª observação	20/4/2	81,14 ± 26,5a	73,50 ± 48,45ab	34,00 ± 22,02b	0,0242
4ª observação	11/1/0	82,79 ± 21,1a	40,49 ± 55,88b	-	0,04
5ª observação	4/0/0	54,44 ± 28,1	-	-	0,0400
Progesterona sérica (ng/mL)					
1ª observação	22/11/10	2,82 ± 2,4b	3,48 ± 3,90b	22,50 ± 9,40a	<0,0001
2ª observação	22/11/9	9,05 ± 7,5b	4,48 ± 3,36b	28,85 ± 8,99a	<0,0001
3ª observação	20/4/2	13,78±8,1	5,80 ± 5,94	29,45 ± 0,35	0,0046
4ª observação	11/1/0	15,60 ± 5,2	-	-	0,0400
5ª observação	11/0/0	25,20 ± 9,6	-	-	0,0594
Média de inseminações por grupo e filhotes por cadela					
Nº de inseminações		3,22 ± 1,0a	2,00 ± 0,95b	1,73 ± 0,79b	<0,0001
Número de filhotes		5,38 ± 1,8	4,29 ± 1,98	4,00 ± 1,93	0,1961

letras diferentes na mesma linha indicam diferença pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.



As citologias realizadas na primeira e segunda consultas não apresentaram diferença estatística entre os grupos. De fato, não há ampla variação do percentual de CSQ do primeiro ao sexto dia após o pico de LH, como descrito por Linde e Karlsson (1984) que relataram porcentagem de CSQ entre 80-90%.

A partir da terceira observação o percentual de CSQ diferiu ($P < 0,05$) entre os grupos em relação à citologia. Neste período de observação, o G3 possuía citologia típica de diestro. Provavelmente, estes animais foram acompanhados e inseminados nos últimos dias do estro, assim, a partir da terceira consulta encontravam-se em diestro citológico, não sendo mais necessário prosseguir com o programa de inseminação. O G2 apresentou esse comportamento na maioria dos animais, mas um animal ainda foi acompanhado até a quarta observação e o G1 após a quinta e última consulta ainda havia 11 animais em estro citológico.

Os animais do G1 puderam ser inseminados durante todo o estro, já que chegaram para as avaliações no início desse período, com progesterona sérica distribuída em valores menores e maiores que 15,0 ng/mL e com citologia vaginal sempre maior ou igual a 70% de CSQ. A dosagem média de P4 inicial para os animais deste grupo foi 2,8 ng/mL, o que segundo estudos indicam pico de LH (HASE *et al.*, 2000; CONCANNON, 2011). Para estes animais, verificou-se a manutenção de elevados percentuais de CSQ durante três consultas seguidas, da segunda a quarta. Estes valores caíram apenas a partir da quinta avaliação, aproximadamente no décimo dia de acompanhamento do ciclo, a níveis que indicam diestro citológico (SCHUTTE, 1967). Estes dados estão de acordo com England (1992) e Silva e colaboradores (1995) que observaram diestro citológico no 7,7 e 11,0 dias, respectivamente, após o pico de LH, estimado pela dosagem de P4 (2,0 a 3,0 ng/mL). Estes animais são geralmente de proprietários mais inexperientes, que ao primeiro sinal de pró-estro os levam para o acompanhamento do ciclo. Por este fato, este grupo apresentou um número superior ($P < 0,05$) de inseminações, entretanto sem diferença significativa para o número de filhotes em relação aos dos demais grupos.

Conclusão

A inseminação artificial vaginal com sêmen “*in natura*”, em cadelas apresentando citologia igual ou superior a 70% de CSQ, e progesterona sérica no intervalo de 2- 22,5 ng/ml não apresenta influencia direto sobre o tamanho da ninhada, o que permite ao profissional inseminador uma boa margem de trabalho durante o estro da cadela.



Referências

- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; LEANDRO, E. E. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.3, p.213-218, 2005.
- CONCANNON, Patrick W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3, p. 200-210, 2011.
- ENGLAND, G. C. W. Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 12, p. 577-582, 1992.
- HASE, M., HORI, T., KAWAKAMI, E., & TSUTSUI, T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 3, p. 243-248, 2000.
- LINDE, C.; KARLSSON, I. The correlation between the cytology of the vaginal smear and the time of ovulation in the bitch. **Journal of Small Animal Practice**, v. 25, n. 2, p. 77-82, 1984.
- SCHUTTE, A. P. Canine Vaginal Cytology—I Technique and Cytological Morphology. *Journal of Small Animal Practice*, v. 8, n. 6, p. 301-306, 1967.
- SILVA, L. D. M.; ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. P. Cervical opening in relation to progesterone and oestradiol during heat in beagle bitches. **Journal of reproduction and fertility**, v. 104, n. 1, p. 85-90, 1995.
- SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**, v. 98, p. 53-60, 2003.
- TSUTSUI, T.; TAKAHASHI, F.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; E CONCANNON, P. W. Prolonged duration of fertility of dog ova. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. s2, p. 230-233, 2009.
- VERSTEGEN, J. P.; SILVA, L. D.; ONCLIN, K. Determination of the role of cervical closure in fertility regulation after mating or artificial insemination in beagle bitches. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 57, p. 31-34, 2001.



TAXA DE CONCEPÇÃO DE CADELAS ARTIFICIALMENTE INSEMINADAS COM BASE NA CITOLOGIA VAGINAL E DIFERENTES NÍVEIS DE PROGESTERONA SÉRICA

CONCEPTION RATE OF ARTIFICIALLY INSEMINATED BITCHES BASED ON VAGINAL CYTOLOGY AND DIFFERENT SERUM PROGESTERONE LEVELS

Rodrigo Ribeiro Machado MENDES^{1*}, Eduardo de Oliveira COSTA¹, Rodrigo F. BITTENCOURT¹, Isabella de Matos Brandão CARNEIRO¹, Gleice Mendes XAVIER, Amanda Íris dos santos CORREIA¹, Roberta Ferreira BORGES¹, Elisiane Sateles dos SANTOS¹

¹Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia. Av. Adhemar de Barros, 500, Salvador, Bahia, Brazil, 40170-110

Autor para correspondência:

Rodrigo Ribeiro Machado Mendes

Rua Carlos Gomes 129, apt, bloco único, 3º andar, Dois de Julho, Salvador, Bahia, Brasil, 40.060-330

Phone: +55 -74988382508

E-mail: rribe841@gmail.com

Resumo

Buscou-se com o estudo determinar a influência dos diferentes momentos da IA com base nos níveis da progesterona sérica sobre a taxa de concepção de cadelas inseminadas com sêmen *in natura*. As cadelas foram separadas nos seguintes grupos G1: fêmeas inseminadas em amplo período da fase estral, cuja dosagem de progesterona variou entre menos e mais que 15 ng/mL; G2: fêmeas inseminadas somente em período cuja progesterona foi menor que 15 ng/mL e G3: fêmeas Inseminadas somente em período cuja progesterona foi maior que 15 ng/mL. As fêmeas foram inseminadas quando o valor de células superficiais e queratinizadas (CSQ) na citologia vaginal foi igual ou superior a 70%. O sêmen foi colhido por manipulação digital e avaliado. A cada inseminação foi realizada a coleta de sangue para dosagem de progesterona sérica. O número de inseminações artificiais no G1 foi superior ($P < 0,05$). A taxa de concepção global do estudo foi de 84%, variando entre 81,8 a 87% entre os grupos, não apresentando, no entanto, diferença estatística. Conclui-se que as inseminações artificiais feitas em cadelas, independente dos níveis de progesterona na fase de estro não interfere diretamente na taxa de concepção das mesmas.

Palavras chaves: Estro, exames complementares, canino.

Abstract

This study aims to determine the influence of different AI moments based on serum progesterone levels on the conception rate of female dogs inseminated with fresh semen. The females were separated into the following groups G1: females inseminated during an extended period of the estrous phase, whose progesterone dosage varied between less and more than 15 ng/mL; G2: females inseminated only in a period whose progesterone was less than 15 ng/mL and G3: females inseminated only in a period whose progesterone was greater than 15 ng/mL. Females were inseminated when the value of superficial and keratinized cells on vaginal cytology was equal to or greater than 70%. Semen was collected by digital manipulation and evaluated. At each insemination, blood was collected to measure serum progesterone. The number of artificial inseminations in G1 was higher ($P < 0.05$). The overall conception rate of the study was 84%, ranging from 81.8 to 87%



between groups, with no statistical difference. It is concluded that artificial inseminations performed in females, regardless of progesterone levels in the estrus phase, do not directly interfere with their conception rate.

Keywords: Estrus, complementary tests, dogs.

Introdução

O ciclo estral das cadelas é dividido em diferentes fases, sucessivas e individualizadas, sendo elas, proestro, estro, diestro, seguida de uma fase chamada anestro (BEAVER, 2001). Cada uma dessas fases provocam alterações ovarianas, uterinas e comportamentais que ocorrem para assegurar a produção, a fertilização de gametas e o desenvolvimento intrauterino do produto (PEIXOTO; SILVA, 2013). Sendo o conhecimento aprofundado desse ciclo estral essencial para o efetivo sucesso da aplicação das biotecnologias da reprodução em cadelas.

O acompanhamento do ciclo estral é de suma importância para o conhecimento da fase em que a cadela se encontra, o que possibilita estimar o período aproximando da ovulação. Dessa forma, o uso de ferramentas de análise laboratorial como a análise sérica de progesterona e a citologia de epitélio vaginal trazem informações essenciais, permitindo determinar se o animal já está apto para cobertura ou ser submetido à alguma biotécnica reprodutiva (MASON, 2018).

O objetivo com o estudo foi determinar a influência do momento da realização da IA em cadelas de acordo com o nível de progesterona sérica sobre a taxa de concepção, utilizando-se ainda como ferramenta de monitoramento do ciclo estral a citologia vaginal.

Material e métodos

Os animais utilizados neste estudo foram atendidos no Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia em um intervalo de 22 meses. Foram atendidos 42 casais de cães, quatro fêmeas retornaram duas vezes, totalizando 46 acompanhamentos do ciclo estral com cães de diferentes raças e tamanhos.

Os animais submetidos ao programa passaram inicialmente por uma consulta clínica, na qual se avaliou os machos e as fêmeas. Além da análise clínica, as fêmeas foram submetidas aos seguintes exames complementares: hemograma completo, pesquisa de brucelose, citologia do epitélio vaginal a cada retorno e dosagem de progesterona em todos os regressos cujas fêmeas foram inseminadas. Para o macho: pesquisa de *Brucella canis* e espermograma completo de todos os ejaculados.



As fêmeas que apresentavam 70% ou mais de CSQ, na análise da citológica vaginal, retornavam no dia seguinte para que se iniciassem as Ias, sendo, a partir de então, acompanhados a cada dois dias.

O sêmen foi colhido por estímulo digital e as amostras analisadas quanto aos aspectos de cinética (vigor, motilidade e motilidade progressiva), integridade de membrana por teste hiposmótico (Bittencourt *et al.*, 2005) e supravital, além da avaliação morfológica em lâmina corada, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

De acordo com os acompanhamentos clínicos e exames realizados, os animais foram separados em diferentes grupos: G1: fêmeas inseminadas em amplo período da fase estral, cuja dosagem de progesterona variou entre menos e mais que 15 ng/mL (n=23); G2: fêmeas inseminadas somente em período cuja progesterona foi menor que 15 ng/mL (n=12) e G3: fêmeas Inseminadas em período cuja progesterona foi maior que 15 ng/mL (n=11).

Após 30 dias da última inseminação, foram efetuadas a ultrassonografia para o diagnóstico de gestação.

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS 9.1.3®). A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio-padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do Procedimento MEANS (PROC MEANS). Os dados de citologia vaginal e níveis de progesterona sérica foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com suas médias sendo comparadas pelo teste de Tukey, com nível de probabilidade de cinco por cento. A taxa de concepção entre os grupos experimentais foi submetida ao teste de Qui-quadrado.

Resultados e discussão

Todos os valores médios e seus desvios padrão, obtidos na citologia vaginal, dosagens de progesterona e taxa de concepção dos diferentes grupos experimentais podem ser observados na Tabela 1.



Tabela 1 - Teor de progesterona sérico de cadela agrupadas de acordo com o teor de progesterona sérico no momento da observação com citologia igual ou maior que 70%.

Item	Nº de Animais Inseminados nos grupos respectivamente	Grupo experimental			Valor-P
		G1	G2	G3	
Citologia Vaginal (% de CSQ)					
observação	22/11/10	75,13 ± 32,7	87,58 ± 12,41	83,09 ± 24,82	0,4072
observação	22/11/9	85,87 ± 26,9	81,33 ± 31,67	85,11 ± 19,19	0,9090
observação	20/4/2	81,14 ± 26,5a	73,50 ± 48,45ab	34,00 ± 22,02b	0,0242
observação	11/1/0	82,79 ± 21,1a	40,49 ± 55,88b	-	0,04
observação	4/0/0	54,44 ± 28,1	-	-	0,0400
Progesterona sérica (ng/mL)					
observação	22/11/10	2,82 ± 2,4b	3,48 ± 3,90b	22,50 ± 9,40a	<0,0001
observação	22/11/9	9,05 ± 7,5b	4,48 ± 3,36b	28,85 ± 8,99a	<0,0001
observação	20/4/2	13,78 ± 8,1	5,80 ± 5,94	29,45 ± 0,35	0,0046
observação	11/1/0	15,60 ± 5,2	-	-	0,0400
observação	11/0/0	25,20 ± 9,6	-	-	0,0594
Média de inseminações e taxa de concepção por grupo					
de inseminações		3,22 ± 1,0a	2,00 ± 0,95b	1,73 ± 0,79b	<0,0001
de concepção (%) ¹		87,0	83,1	81,8	0,9145 ¹

letras diferentes na mesma linha indicam diferença pelo teste de Tukey com P<0,05.

¹ Significância pelo teste Qui-quadrado



Nesse estudo, a taxa de concepção e o número médio de inseminações foram de 84,8% e 2,5, respectivamente. As taxas de concepção não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos estudados, diferente do número de inseminações que foi superior ($P<0,05$) para o G1, em relação aos demais. Este fato ocorreu, pois, as cadelas do primeiro grupo foram acompanhadas do início ao fim do ciclo, sendo submetidas a um maior número de IA, diferente das cadelas do G2 e G3, que foram acompanhados somente no início ao meio ou no fim do ciclo, o que levou a menos oportunidades de inseminação.

No G2 as fêmeas iniciaram as avaliações com média de progesterona de 3,5 ng/mL, correspondente ao período de transição entre pico de LH e ovulação (HASE *et al.*, 2000; TSUTSUI *et al.*, 2009) e foram inseminadas até dosagens médias de 5,8 ng/mL, níveis estes compatíveis com a ovulação (WRIGHT, 1990). Os animais desse grupo foram inseminados no momento considerado como o ideal por inúmeros autores, entre o dia zero e o quinto, em relação a ovulação (ENGLAND *et al.*, 2006; TSUTSUI *et al.*, 2009). E, apesar de apresentar um número de inseminações inferior ($P<0,05$) que o G1, as fêmeas do G2 não obtiveram taxas inferiores de gestação ($P>0,05$). Este fato pode ser explicado já que o espermatozoide canino pode ficar viável até onze dias no sistema genital feminino (DOAK *et al.*, 1967).

O G3 representa os animais que possuem citologia vaginal maior ou igual a 70% CSQ e níveis de P4 sérica maior que 15 ng/mL, valor esse encontrado na terceira consulta do G1 (sexto dia após pico de LH). Estes valores são semelhantes aos observados por Mestre e colaboradores (1990) que encontraram 16 ng/ml de progesterona no 8º dia após o pico de LH. Esta dosagem indica que a fêmea já passou pelo período de pico de LH, ovulação e maturação, período citado por Silva e colaboradores (1995) como o momento em que há o fechamento da cérvix, o que poderia reduzir o índice de concepção na inseminação vaginal. Entretanto, estudos mostram que o fechamento da cérvix parece não ser uma barreira para a passagem dos espermatozoides (TSUTSUI *et al.*, 2009). Este relato pode explicar porque os índices de concepção obtidos com a inseminação vaginal das fêmeas do G3 não foram inferiores ($P>0,05$) aos dos demais grupos.

Conclusão

Os níveis de progesterona sérica obtidos neste estudo, durante o protocolo de inseminação artificial em cadelas, em diferentes momentos da fase do estro, não tiveram efeito direto sobre taxa de concepção, o que significa que a IA pode ser realizada dentre as faixas



estudadas, tendo como referência principal, para o início das inseminações, o percentual de CSQ obtidas na citologia vaginal.

Referências

BEAVER, Bonnie V. **Comportamento canino: um guia para veterinários**. Roca, 2001.

BITTENCOURT, Rodrigo Freitas et al. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 213-218, 2005.

DOAK, R. L.; HALL, A; DALE, H. E. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 13, n. 1, p. 51-58, 1967.

ENGLAND, G. C. W.; BURGESS, C. M.; FREEMAN, S. L.; SMITH, S. C.; PACEY, A. A. Relationship between the fertile period and sperm transport in the bitch. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1410-1418, 2006.

HASE, M., HORI, T., KAWAKAMI, E., & TSUTSUI, T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 3, p. 243-248, 2000.

MASON, Stuart J. Current review of artificial insemination in dogs. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 48, n. 4, p. 567-580, 2018.

MESTRE, J.; WANKE, M.; SUCHEYRE, S. Exfoliate vaginal cytology and plasma concentrations of progesterone, luteinising hormone and oestradiol-17 β during oestrus in the bitch. **Journal of Small Animal Practice**, v. 31, n. 11, p. 568-570, 1990.

PEIXOTO, G.C.X; SILVA, A.R. Monitoramento do Ciclo Estral em Cadelas. **Revista Cães e Gatos**, a. 29, n166, p. 10-16, 2013.

SILVA, L. D. M.; ONCLIN, K.; VERSTEGEN, J. P. Cervical opening in relation to progesterone and oestradiol during heat in beagle bitches. **Journal of reproduction and fertility**, v. 104, n. 1, p. 85-90, 1995.

TSUTSUI, T.; TAKAHASHI, F.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; E CONCANNON, P. W. Prolonged duration of fertility of dog ova. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. s2, p. 230-233, 2009.

WRIGHT, P. J. Application of vaginal cytology and plasma Progesterone determinations to the management of reproduction in the bitch. **Journal of small animal practice**, v. 31, n. 7, p. 335-340, 1990.



TAXAS DE FERTILIZAÇÃO EM MURINOS UTILIZANDO DIFERENTES PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO

FERTILIZATION AVERAGE IN MURINES USING DIFFERENT SUPEROVULATION PROTOCOLS

Ana Ruth Reinaldo MENEZES¹; Israel Levi Nascimento SILVA²; Solano Dantas MARTINS³;
João Eudes Farias Cavalcante-FILHO⁴; Maria Alice Felipe OLIVEIRA³; Alessandro Silva
FERREIRA⁵; Vânia Marilande CECATTO⁶; Valdevane Rocha ARAÚJO⁶

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE/CCS), Fortaleza - CE, Brasil.

²Universidade Estadual do Ceará (UECE/FAVET), Fortaleza - CE, Brasil.

³Universidade Federal do Ceará (UFC/PPGB), Fortaleza - CE, Brasil.

⁴Universidade Estadual do Ceará (UECE/PPGCV), Fortaleza - CE, Brasil.

⁵Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção - CE,
Brasil.

⁶Professora da Universidade Estadual do Ceará (UECE/CCS), Fortaleza-CE, Brasil.

*E-mail: anaruth.reinaldo@aluno.uece.br

Abstract

The present study aimed to investigate the impact of different doses of equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) combined on *in vitro* embryo production in rats of different ages. Wistar rats (n=42) were divided into two groups: Young (7 to 9 weeks) and Adults (10 to 13 weeks). The groups underwent intraperitoneal application of sterile saline solution (control treatment) or a combination of different doses of eCG (75, 100 or 150 IU/Kg) and after 48h with different doses of hCG (50 or 75 IU/Kg). After 24 hours of hCG administration, the rats were euthanized and dissected, and the cumulus-oocyte complexes (COCs) were recovered and counted. For *in vitro* fertilization (IVF), COCs were incubated with sperm collected from Wistar rats (n=7) and later, the presumptive zygotes were sent to *in vitro* culture (IVC) and evaluated for the degree of cleavage 12-16 hours after IVF (day 0). When undergoing IVF, the Adult Group had a higher percentage of fertilized oocytes compared to the Young Group, regardless of treatment. It was concluded that the combination of 75 IU/Kg of eCG followed by 50 IU/Kg of hCG and 75/75 effectively induced superovulation in adults rats, providing a higher percentage of cleaved oocytes.

Key words: superovulation, *in vitro* fertilization, gonadotropins

Introdução

A superovulação é uma técnica que consiste na estimulação hormonal ovariana com o objetivo de recuperar um número significativo de oócitos maduros e aptos à fertilização (LEE, 2017). Em animais experimentais a técnica tem sido relatada em diferentes espécies como ratos (KON et al., 2005) e camundongos (KANTER *et al.*, 2004). Nestes animais, a técnica é aplicada para aumentar o número de complexos cumulus-oócito (CCOs) ovulados a serem destinados a



produção *in vitro* de embriões com desenvolvimento sincronizado, no desenvolvimento de animais transgênicos e produção de células tronco-embrionárias (CORNEJO-CORTE'S *et al.*, 2006).

Apesar dos protocolos utilizando a combinação de eCG e hCG serem aplicados para induzir superovulação em murinos, estudos relatam uma ampla variedade de concentrações, bem como resultados divergentes quanto à eficiência dos protocolos (NOORANIZADEH *et al.*, 2018). Além da dose de hormônios aplicada, a idade é outro ponto que deve ser considerado como possível variável capaz de influenciar nas respostas obtidas em ratos (MUKUMOTO, 1995; KAGABU; UMEZU, 2006). Por esse motivo, os diferentes protocolos encontrados na literatura apresentam resultados discrepantes na recuperação de CCOs e limitações em relação a capacidade de obtenção de embriões de alta qualidade, o que dificulta, por exemplo, a produção de células-tronco embrionárias (CORNEJO-CORTE'S *et al.*, 2006).

Nesse cenário, a necessidade de um protocolo de superovulação que compreenda a melhor dose, tempo e que considere a idade dos animais durante a indução do protocolo hormonal são assuntos que vêm sendo discutidos e até o momento não apresentam soluções definitivas (ZHANG *et al.*, 2018). Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo investigar o efeito de diferentes doses de eCG combinadas ao hCG sobre a estimulação à ovulação e consequente recuperação de CCOs maduros e competentes para a produção embrionária após FIV em ratas wistar de diferentes idades reprodutivas.

Material e métodos

Todos os procedimentos com os animais foram autorizados pelo comitê de ética para uso de animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará, sob o seguinte número de protocolo nº 09473858-2022. As ratas foram obtidas do biotério central pertencente ao Instituto Superior de Ciências Biomédicas (ISCB-UECE) e mantidas a $26 \pm 2^\circ\text{C}$ com um ciclo 12/12 h de luz/escuro, com água e ração *ad libitum*.

Para o experimento foram utilizadas 42 fêmeas da linhagem Wistar, divididas em dois grupos, sendo eles: Grupo Jovens ($n = 23$), fêmeas com idade entre 7 a 9 semanas, e Grupo Adultas ($n = 19$), fêmeas com idade entre 10 a 13 semanas (MUKUMOTO, 1995). Em ambos os grupos, ratas Wistar foram submetidas primeiramente ao tratamento por injeção intraperitoneal na ausência (200 μl de solução salina estéril - tratamento controle $n = 3$) ou presença do hormônio eCG, com diferentes doses (75, 100 ou 150 UI/Kg). Após 48h, as fêmeas foram submetidas ao tratamento



por injeção intraperitoneal na ausência (200 µL de solução salina estéril - tratamento controle n = 3) ou presença do hormônio hCG, com diferentes doses (50 ou 75 UI/Kg). Somente 24h após a aplicação do hormônio hCG, os animais foram eutanasiados por meio de insensibilização com anestésicos (8 mg/Kg de Xilasina e 60 mg/Kg de Cetamina), seguida de decapitação.

Os animais tiveram o oviduto isolado e em seguida os CCOs foram coletados com o auxílio de agulhas 21G acopladas a seringas de 1 mL. Os oócitos foram, então, alocados em gotas de 70 µL de meio FIV-TALP (Vitrogen) em placa de Petri, sob óleo mineral (Sigma M8410). Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo de ratos Wistar e, em seguida, foram incubados com os oócitos. Posteriormente, os presumíveis zigotos foram encaminhados para o cultivo *in vitro* (CIV) embrionário e avaliados quanto ao percentual de fertilização e ao grau de clivagem 12-16 horas após a FIV (dia 0), sendo realizada troca parcial de meio e avaliação das taxas de desenvolvimento embrionário a cada dois dias. Todo o cultivo foi realizado a 37°C em atmosfera umidificada a 5% de CO₂, durante 7 dias (AOTO *et al.*, 2011).

Em função da natureza preliminar dos dados, os mesmos foram organizados em uma tabela na qual foi apresentada a porcentagem de presumíveis zigotos calculada através da fórmula: N° CCOs clivados / N° CCOs recuperados x100.

Resultados e discussão

A Tabela 01 demonstra o percentual de oócitos clivados a partir dos CCOs recuperados em cada tratamento de ambos os grupos. Foram obtidos resultados preliminares da FIV destes oócitos. No Grupo Jovens, a fertilização foi confirmada apenas nos tratamentos de 75/75 e 100/75 com percentual de oócitos fertilizados de 30% e 50% e taxa de clivagem de 40% e 12,50%, respectivamente (Tabela 01). No Grupo Adultas, a fertilização foi confirmada em todos os tratamentos, com exceção do 150/75. Tendo os grupos 75/50 e 75/75 o maior percentual de oócitos clivados com 79,16% e 87,50%, respectivamente (Tab. 01). As mesmas doses mantiveram uma maior taxa de clivagem durante o cultivo *in vitro* (CIV), em relação aos demais grupos.



Tabela 01 - Avaliação do percentual de oócitos fertilizados e taxa de clivagem nos Grupos Jovens e Adultas em diferentes tratamentos.

Tratamento	Grupo Jovens		Grupo Adultas	
	Percentual de Oócitos Fertilizados (%)	Taxa de Clivagem (%)	Percentual de Oócitos Fertilizados (%)	Taxa de Clivagem (%)
Controle	0	0	57,14	28
75/50	0	0	79,16	70
100/50	0	0	25	12,5
150/50	0	0	40	60
75/75	30	40	87,5	70
100/75	50	12,5	50	25
150/75	0	0	0	0

Tratamentos: Controle; 75eCG/50hCG; 100eCG/50hCG; 150eCG/50hCG; 75eCG/75hCG; 100eCG/75hCG; 150eCG/75hCG;

A partir dos dados preliminares da FIV e CIV, foram observadas baixas taxas na fertilização dos oócitos obtidos nos tratamentos do Grupo Jovens, bem como uma menor taxa de clivagem durante o desenvolvimento embrionário. Enquanto no Grupo Adultas, grande parte dos tratamentos apresentaram oócitos fertilizados, com exceção da maior dose utilizada (150/75). Do mesmo modo, Popova *et al.* (2002) já haviam demonstrado que a viabilidade dos zigotos é independente do protocolo de superovulação. Além disso, Cornejo-Corte's et al. (2006) obtiveram maior dificuldade em cultivar os zigotos derivados de doses maiores de eCG, independentemente da dose hCG utilizada, o que corrobora com nossos resultados, nos quais as maiores doses resultaram em menores taxas de desenvolvimento embrionário.

Sabe-se que doses menores de eCG e hCG, podem permitir um adequado desenvolvimento, maturação e ovulação folicular, principalmente quando a combinação das gonadotrofinas é similar (TAIN *et al.*, 2001; CORNEJO-CORTE'S *et al.*, 2006) o que pode explicar as melhores taxas de desenvolvimento em concentrações menores.

Conclusão



Os protocolos constituídos pela aplicação de 75 IU/Kg de eCG seguido de 50 IU/Kg of hCG (75/50) e 75 IU/Kg de eCG seguido de 75 IU/Kg of hCG (75/75) em ratas adultas demonstrou a obtenção de CCOs de maior qualidade aumentando as taxas de fertilização e a produção de embriões com melhor qualidade.

Referências

- AOTO, T.; TAKAHASHI, R.; UEDA, M.; A protocol for rat in vitro fertilization during conventional laboratory working hours. **Transgenic Research**, v. 20, n. 6, p. 1245-52, 2011.
- CORNEJO-CORTÉS, M. A; SÁNCHEZ- TORRES, C; VÁZQUEZ-CHAGOVÁN, J. C.; Rat embryo quality and production efficiency are dependent on gonadotrophin dose in superovulatory treatments. **SAGE**, v. 40, n. 1, p. 87-95, 2006.
- KAGABU, Satoshi; UMEZU, Motoaki. Variation with Age in the Numbers of Ovulated Ova and Follicles of Wistar-Imamichi Adult Rats Superovulated with eCG-hCG. **Experimental Animals**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 45-48, 2006.
- KANTER, M.; YILDIZ, C.; MERAL, I.; KOC, A.; TASAL, I.; Effects of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 393-398, jan. 2004.
- KON, H.; TOHEI, A.; HOKAO, R.; SHINODA, M.; Estrous Cycle Stage-Independent Treatment of PMSG and hCG can Induce Superovulation in Adult Wistar-Imamichi Rats. **Experimental Animals**, v. 54, n. 2, p. 185-187, 2005.
- LEE, M.; AHN, L.J.; LEE, R.A; KO, W.D; YANG, S.W; LEE, G; AHN, Y.J; LIM, M.J.; Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes. **Cell and molecules**, v. 40, n. 8, p. 558-566, 2017.
- MUKUMOTO, Sueo; MORI, Keiko; ISHIKAWA, Hisaaki. Efficient Induction of Superovulation in Adult Rats by PMSG and hCG. **Experimental Animals**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 111-118, 1995.
- NORANIZADEH, M. H; MOGHEISEH, A; KAFI, M; SEPEHRIMANESH, M; VASEGHI, H.; Induction of superovulation in mature mice and rats using serum of spayed female dogs. **Biomed Central**, v. 34, n. 4, p. 211-215, 2018.
- POPOVA, E.; KRIVOKHARCHENKO, A.; GANTEN, D.; BADER, M.; Comparison between PMSG- and FSH-induced superovulation for the generation of transgenic rats. **Molecular Reproduction And Development**, v. 63, n. 2, p. 177-182, 2002.
- TAIN, C.F.; GOH, V.H.H.; NG, S.C.; Effects of hyperstimulation with gonadotrophins and age of females on oocytes and their metaphase II status in rats. **Molecular Reproduction And Development**, v. 55, n. 1, p. 104-108, jan. 2000.
- ZHANG, J; LAI, ZHIWEN; SHI, L; TIAN, Y; LUO, A; XU, Z; MA, X; WANG, S.; Repeated superovulation increases the risk of osteoporosis and cardiovascular diseases by accelerating ovarian aging in mice. **AGING**, v. 10, n. 1, p. 1098-1102, 2018.



USO DE DOPPLERFLUXOMETRIA NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM FÊMEAS BUBALINAS (*BUBALUS BUBALIS*) NA ILHA DO MARAJÓ

DOPPLERFLUXOMETRY IN THE EARLY DIAGNOSIS OF PREGNANCY IN FEMALES BUFFALOS (*Bubalus bubalis*) IN THE ILHA DO MARAJÓ

Carolina Vitoria Rodrigues CARLOS ^{1*}; Beatriz Rosa SILVA²; Vitoria Fonseca RODRIGUES²; Deívia Rodrigues DA SILVA ²; Iago da Conceição RODRIGUES ³ Haroldo Francisco Lobato RIBEIRO ⁴; Sebastião Tavares ROLIM FILHO ⁵

*carolinavitoria730@gmail.com

Abstract

The buffalo is an important livestock precursor, occupying a critical niche in many agricultural systems considered underprivileged, and, with the benefit of accelerating the genetic increase in herds, in a general way and in a short space of time, biotechnologies are inserted. Therefore, this work intends to analyze the efficiency of the use of Dopplerflowmetry in the early diagnosis of pregnancy in the buffalo species, in an attempt to diagnose 20 days after fixed-time artificial insemination (FTAI), as well as to evaluate the vascularization of the corpus luteum in this gestational period and its relationship with proof of positive pregnancy in the species. In addition, the activities were carried out at Fazenda Paraíso, municipality of Cachoeira do Arari, 19 lactating multiparous buffalo females (*Bubalus bubalis*) were used, one of them a heifer, were kept in an extensive system with pastures of mombaça, quicuio and Capiacu, in addition to water and mineral salt ad libitum. All buffaloes were submitted to the same estrus synchronization protocol for 12 days. The protocol consisted of the IM application of 2.0mg of BE (RIC-BE®, Agener União Química, Brazil) together with an intravaginal device of 0.5g of P4 (Primer Monodose®, Agener União Química) on a random day of the cycle. estral, being considered the D0 of the protocol. Removal of the P4 implant and IM application of 300UI of eCG (Novormon®, Zoetis) and 0.5mg of PGF2a (Estron®, Agener União Química) IM, on D11, 25µg of GnRH (TEC-Relín®) is applied via IM, Chemical Union Agent). In addition, evaluation of the corpus luteum was performed by ultrasound on the 20th and 30th day after insemination. For this purpose, B-mode ultrasound was used to determine the CL diameter (LCD) by means of the arithmetic mean between two measurements in the largest cross-section of the CL. The luteal images produced at the time of evaluation were submitted to objective evaluation, and later the total area of the CL (ACL) was calculated using the cursor of the device to indicate the entire area of the circumference of the CL. Still, it is clear that conception rates (Tx Cp) in FTAI programs are influenced by several environmental and individual factors in males and females. Therefore, the Tx Cp on the 20th and 30th day are 5.3% and 21.1%, respectively, and the overall conception rate remained at 21.1% at the end of the experiment. Regarding the CL area, a general average was found, without distinction between groups, of $2.92 \text{ cm}^2 \pm 0.61 \text{ cm}^2$ and after the sizing, 2 groups were created: high vascularization (greater than or equal to 75%) and low vascularization (less than or equal to 50%), with a mean of $2.97 \text{ cm}^2 \pm 0.29 \text{ cm}^2$ and $2.12 \text{ cm}^2 \pm 0.81 \text{ cm}^2$, respectively, and the high vascularization group obtained better results in predicting pregnancy and pregnancy rates. Therefore, the results found in this study demonstrate that the Doppler ultrasound technique with color change is a tool that can predict a positive diagnosis of pregnancy 20 days after FTAI in



buffaloes, while the assessment of CL functionality is more effective at 30 days. days with a definitive diagnosis of pregnancy.

Keywords: FTAI; Corpus luteum; vasculatization.

Introdução

O búfalo é um importante precursor pecuário, ocupando um nicho crítico em muitos sistemas agropecuários considerados desfavorecidos, entretanto detém de um estado que lhe permite o fornecimento de leite, de carne e da força de trabalho (GASPARINI, 2002) e, com o provento de acelerar o incremento genético em rebanhos, de uma forma geral e em reduzido espaço de tempo, a inserção de biotecnologias como a ultrassonografia em modo doppler proporcionam benefícios econômicos e produtivos na bubalinocultura.

Além disso, uma das características anatômicas da espécie e que a diferencia dos bovinos é o sistema reprodutor, sendo o ovário menor em comprimento, largura e peso além do corpo lúteo apresentar difícil proeminência, o uso da dopplerfluxometria e seu potencial dentro da pesquisa reprodutiva baseado na capacidade de avaliar a funcionalidade de tecidos e órgãos pela menor ou maior perfusão sanguínea, assim estimando de forma não invasiva a funcionalidade do corpo lúteo (PUGLIESE *et al.*, 2017).

Na medicina veterinária, assim como na medicina humana, a ultrassonografia com Doppler vem sendo empregada para monitoramento de gestação em ovelhas, vacas (BOLLWEIN *et al.*, 2002; PANARACE *et al.*, 2006), éguas (BOLLWEIN *et al.*, 2004), cadelas (NAUTRUP, 1998; DI SALVO *et al.*, 2006; MIRANDA E DOMINGUES, 2010; BLANCO *et al.*, 2011), gatas (SCOTTI *et al.*, 2008; BRITO *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012) e coelhas (POLISCA *et al.*, 2010). Entretanto não são relatados seu uso em búfalas, surgindo um novo cenário para a espécie, evidenciando-se a importância da ultrassonografia Doppler para o monitoramento reprodutivo de fêmeas bubalinas.

Portanto, partindo desse pressuposto, esse trabalho pretende analisar a eficiência do uso da dopplerfluxometria no diagnóstico precoce de gestação na espécie bubalina, na tentativa de diagnóstico 20 dias após inseminação artificial em tempo fixo (IATF), assim como avaliar a vascularização do corpo lúteo neste período gestacional e sua relação com a comprovação de gestação positiva na espécie.

Material e métodos



Número de protocolo de licença do comitê de ética nº 1049270319. O estudo foi conduzido na propriedade Fazenda Paraíso, localizada no município de Cachoeira do Arari, Ilha do Marajó, Pará. Foram utilizadas 19 fêmeas bubalina (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah (*River buffalo*), multíparas em lactação e uma novilha. Os animais foram mantidos em condições semelhantes de criação sistema extensivo com pastejo rotacionado em pastagens de Mombaça (*Panicum Maximum*), quicuío (*Brachiaria Humidicula*) e Capiacu (*Pennisetum purpureum* Scum cv. BRS Capiacu) como suplementação volumosa além de água e sal mineral *adlibitum*.

Todas as búfalas foram submetidas ao mesmo protocolo de sincronização de estro por 12 dias. O protocolo consistiu na aplicação IM de 2,0mg de BE (RIC-BE®, Agener União Química, Brasil) juntamente com um dispositivo intravaginal de 0,5g de P4 (Primer Monodose®, Agener União Química, Brasil) em um dia aleatório do ciclo estral das búfalas, sendo este considerado o D0 do protocolo. Retirada do implante de P4 e aplicação IM de 300UI de eCG (Novormon®, Zoetis, Brasil) e 0,5mg de PGF2 α (Estron®, Agener União Química, Brasil) também IM, já no D11 aplica-se via IM 25 μ g de GnRH (TEC-Relin®, Agener União Química, Brasil). As aplicações dos dias 0, 9 e 11 são realizados sempre às 16:00 horas enquanto a do D12, dia no qual é realizada a inseminação deve ser feita 16 horas após a aplicação do D11 (08:00 horas).

Foi utilizado aparelho ultrassonográfico com as funções de modo brilho e modo Doppler colorido para a realização do presente trabalho, o aparelho foi ajustado em modo Bidimensional para identificar estruturas e em seguida adicionados o modo color Doppler e Espectral Doppler para determinação da perfusão sanguínea na qual a direção do fluxo sanguíneo foi indicada pelas cores azul e vermelho e sua velocidade na estrutura pretendida, o corpo lúteo, sendo que no presente trabalho o diagnóstico de gestação foi realizado de forma precoce, ocorrendo após 20 dias do dia 12 (dia da inseminação), sendo neste caso realizado no dia 32.

Além disso, avaliação do corpo lúteo foi realizada por ultrassonografia no 20º dia após inseminação. Para tanto, empregou-se a ultrassonografia em modo B para o diâmetro do CL (DCL) por meio da média aritmética entre duas mensurações na maior secção transversal do CL. As imagens luteais produzidas no momento da avaliação foram submetidas a avaliação objetiva de acordo com Arêas (2012), onde calculou-se a área total do CL (ACL) empregando o cursor do aparelho para indicar a toda a área da circunferência do CL.

Os dados foram tabulados no programa Office Excel® e posteriormente analisados no próprio programa da Microsoft, realizando as médias aritméticas e demais cálculos quanto a área, dimensão e vascularização, além das análises subjetivas.

Resultados e discussão

É notório que as taxas de concepção (TxCp) em programas de IATF são influenciadas por diversos fatores ambientais e individuais em machos e fêmeas. Logo, no presente estudo a TxCp no 20º (Imagem 2) e 30º dia (Imagem 3), são de 5,3% e 21,1%, respectivamente e a taxa de concepção geral continuou sendo 21,1% ao final do experimento.

Imagem 2 - Imagem ultrassonográfica aos 20 dias de gestação em fêmeas bubalinas.



Fonte: Autoria própria.

Imagem 3 - Imagem ultrassonográfica aos 30 dias de gestação em fêmeas bubalinas.



Fonte: Autoria própria.



No que diz respeito a área do CL, foi encontrado média geral e sem distinção em grupos, de $2,92 \text{ cm}^2 \pm 0,61 \text{ cm}^2$. Após o dimensionamento (Tabela 2) o mesmo foi dividido em 2 grupos: Alta vascularização ($>75\%$) e baixa vascularização ($<50\%$), com média de $2,97 \text{ cm}^2 \pm 0,29 \text{ cm}^2$ e $2,12 \text{ cm}^2 \pm 0,81 \text{ cm}^2$, respectivamente.

Tabela 2 - Diâmetro do corpo lúteo (cm), área total do corpo lúteo (cm^2) e vascularização (%).

Grupos	N	DCL (cm)	ACL (cm^2)	Vascularização (%)
		Min – Max		
Alta vascularização	6	1,4cm - 2,4cm	$2,97 \text{ cm}^2 \pm 0,29 \text{ cm}^2$	$\geq 75\%$
Baixa vascularização	12	0,9cm - 1,9cm	$2,12 \text{ cm}^2 \pm 0,81 \text{ cm}^2$	$\leq 50\%$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Siqueira *et al.* (2013) realizaram a mesma classificação, porém para bovinos, ainda assim, seguindo a classificação entre alta e baixa vascularização obtendo sensibilidade para os resultados relacionados as taxas de prenhez, entretanto, com falsos negativos. Durante o experimento dois (2/6) animais do grupo de alta vascularização estavam prenhas e um animal (1/12) para o grupo de baixa vascularização, assim podendo corroborar a relação entre a vascularização e a prenhez, determinando a implantação do embrião no útero e predizendo a eficiência do diagnóstico de gestação precoce a partir da vascularização.

Conclusão

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho demonstram que a técnica de ultrassom Doppler com mudança de cor é uma ferramenta que pode predizer o diagnóstico positivo de prenhez 20 dias após IATF em bubalinas, já a avaliação da funcionabilidade do CL demonstra-se mais eficaz aos 30 dias com diagnóstico definitivo da prenhez.

Referências

ARÊAS, V. S. **Uso de doppler colorido na avaliação funcional do corpo lúteo em bovinos.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.



ALMEIDA, J. et al. **Use of cooled buffalo semen as a strategy to increase conception rates in fixed-time artificial insemination programs during unfavorable reproductive periods.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 73, p. 560-570, 2021.

BOLLWEIN H, BAUMGARTNER U, STOLLA R. **Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy.** Theriogenology, v.57, p.2053-2061, 2002.

BOLLWEIN H, WEBER F, WOSCHÉE I, STOLLA R. **Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares.** Theriogenology, v.61, p.499-509, 2004

BLANCO PG, RODRÍGUEZ R, RUBE A, ARIAS DO, TÓRTORA M, DÍAZ JD, GOBELLO C. **Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy.** Anim Reprod Sci, v.126, p.130-135, 2011.

BRITO AB, MIRANDA SA, RUAS MR, SANTOS RR, DOMINGUES SFS. **Assessment of feline fetal viability by conceptus echobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries.** Anim Reprod Sci, v.122, p.276-281, 2010.

DI SALVOP, BOCCI F, ZELLI R, POLISCA A. **Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch.** Vet Sci, v.81, p.382-388, 2006.

GOBELLO, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos.** Ed. Intervet Argentina S.A., 1º ED., Buenos Aires, Argentina, p.107-115, 2004.

MIRANDA SA, DOMINGUES SFS. **Conceptus ecobiometry and triplex Doppler ultrasonography of uterine and umbilical arteries for assessment of fetal viability in dog.** Theriogenology, v.74, p.608-617. 2010.

MOHAMMED, Kamel ME et al. **Application of advanced reproductive biotechnologies for buffalo improvement with focusing on Egyptian buffaloes.** Asian Pacific Journal of Reproduction, v. 7, n. 5, p. 193, 2018.

NAUTRUP CP. **Doppler ultrasonography of canine maternal and fetal arteries during normal gestation.** J Reprod Fertil, v.112, p.301-314, 1998.



USO DO MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO POR IMERSÃO EM AGULHAS PARA A CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES PRÉ PÚBERES

USE OF THE NEEDLE IMMERSION VITRIFICATION METHOD FOR THE CRYOPRESERVATION OF TESTICULAR TISSUE OF PREPUBERAL DOGS

Ana Glória PEREIRA^{1*}; Andréia Maria da SILVA¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Náyra Rachel Nascimento LUZ¹; Tayná Moura MATOS¹; Thales Pinheiro Cavalcanti BEZERRA²; Alexandre Rodrigues SILVA¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Rua Francisco Mota, 572 - Pres. Costa e Silva, Mossoró - RN, 59625-900.

²Universidade de Fortaleza – UNIFOR, Av. Washington Soares - Edson Queiroz, Fortaleza - CE, 60811-905

*E-mail: anagloriavet@gmail.com

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of vitrification by immersion in needles on the conservation of testicular tissue in prepubertal dogs. For this purpose, five pairs of testes from males aged between 3 and 5 months were collected. The testes were fragmented and vitrified. Based on the analysis of the morphology of the seminiferous tubules, vitrification by immersion in needles was efficient in preserving the integrity of the basement membrane, presenting similar results to the fresh group ($P > 0.05$). Regarding the parameters of cell distinction, nuclear visualization, nuclear condensation and structure, there was a significant reduction in the vitrified group, which is already expected for cryopreserved testicular tissue. Regarding the viability of the cells present in the testicular tissue, there was a significant reduction ($P < 0.05$) in the viability of the cryopreserved tissue ($52.3 \pm 4.1\%$) when compared to the fresh tissue ($82.8 \pm 3.4\%$) when compared to. The results found in the present work contribute to the development of a protocol for cryopreservation of testicular tissue from prepubertal dogs. Needle immersion vitrification proves to be a promising technique, which allows the preservation of membrane integrity in the seminiferous tubules, as well as presents similar results to other vitrification techniques, becoming an alternative for the conservation of canine germplasm.

Keywords: Spermatogenesis, Biotechnology, Cryopreservation.

Introdução

A criopreservação de espermatozoides é o procedimento mais utilizado na formação de bancos de germoplasma. No entanto, a coleta de sêmen nem sempre é possível. Nos casos de animais pré-púberes, bem como aqueles que sofreram de alguma patologia obstrutiva cujas sequelas resultaram em azoospermia, a única opção disponível para a preservação do material genético masculino é a criopreservação do tecido gonadal (COMIZZOLI *et al.*, 2014; ONOFRE *et al.*, 2016).

A criopreservação de tecido testicular possibilita salvaguardar o material genético proveniente de animais em qualquer estágio reprodutivo, ou que tenham morrido subitamente,



tornando-se uma importante ferramenta para a conservação de espécies ameaçadas de extinção ou de alto valor genético (THUWANUT *et al.*, 2013). O tecido testicular contém espermatogônias, células primárias que dão origem aos espermatozoides por meio do processo de espermatogênese. Esse tecido pode ser criopreservado e a espermatogênese pode ser concluída *in vitro* após descongelamento. Os espermatozoides obtidos do meio de cultivo podem ser utilizados em programas de melhoramento animal por meio de técnicas como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (YOKONISHI *et al.*, 2014).

A vitrificação por imersão em agulhas é um método recente, mas que tem apresentado bons resultados na preservação da integridade das células do tecido testicular de cães domésticos adultos (PICAZO *et al.*, 2022) e selvagens, como o lobo cinzento (ANDRAE *et al.*, 2021). Os fragmentos do tecido são transpassados por uma agulha, o que maximiza a condutividade térmica, acelerando o processo de vitrificação, evitando a formação de cristais de gelo (WANG *et al.*, 2008). Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da técnica de vitrificação por imersão em agulhas na preservação do tecido testicular de cães pré-púberes.

Material e métodos

Foram coletados cinco pares de testículos provenientes de orquiectomias eletivas realizadas em clínicas veterinárias da cidade Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte. Os animais utilizados eram machos, de 3 a 5 meses de idade, hígidos e domiciliados. Cada par de testículos foi dividido em fragmentos de 3mm³, dos quais dois fragmentos foram imediatamente fixados em Bouin, para análise morfológica por histologia clássica e análise da viabilidade celular por meio de microscopia de fluorescência. Os tecidos fragmentados foram imersos em duas soluções contendo os crioprotetores Dimetilsulfóxido (DMSO) e Etilenoglicol (EG). A primeira solução, constituída de DMEM acrescido de 0,25 M de sacarose, 10% de SFB (Soro Fetal bovino) e 1,4M de cada crioprotetor, foi considerada uma solução de equilíbrio. A solução de vitrificação foi constituída de DMEM acrescido de 0,5 M de sacarose, 10% de SFB e 2,8M de cada crioprotetor. Os fragmentos foram imersos 10 minutos em solução de equilíbrio e 5 minutos na solução de vitrificação. Em seguida, foram enxutos com gaze e submetidos a vitrificação. Os fragmentos foram espetados em agulhas 30 G, imersas em nitrogênio líquido e transferidas para criotubos, as amostras foram acondicionadas em botijões criobiológicos por uma semana. Após esse período, o material foi retirado dos botijões, exposto a temperatura ambiente durante 1 minuto e, então imerso em banho



maria a 37°C até o completo derretimento da solução de vitrificação. Os crioprotetores foram removidos do tecido testicular através de banhos consecutivos, de 5 minutos de duração cada, utilizando DMEM suplementado com SFB e concentrações decrescentes de sacarose (0,5M, 0,25M e 0M).

As amostras a fresco e vitrificadas foram analisadas quanto à morfologia por meio do processamento para histologia clássica, seguindo-se da análise em microscopia de luz. Foram analisados 30 túbulos seminíferos, de acordo com a integridade e o grau de separação da membrana basal, distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, visualização nuclear, condensação nuclear e organização estrutural do túbulo. A avaliação foi feita por meio de escores de 1 a 3, onde 3 representa o melhor resultado, com a preservação de todas as estruturas analisadas e organização celular, e 1 indica comprometimento dos parâmetros avaliados (Silva et al., 2021). Para análise da viabilidade, as células testiculares foram isoladas por meio de um protocolo de digestão enzimática utilizando-se a colagenase e, em seguida, marcadas utilizando-se as sondas fluorescentes iodeto de propídio (0,5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato e PBS) e 3 µL de Hoechst 33342 (40 mg/mL em PBS) durante 10 min a 37 ° C. Um total de 100 células foram contadas e classificadas como inviável (fluorescência vermelha; iodeto de propídio) ou viável (fluorescência azul; Hoechst 33342) (Silva et al., 2021).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para todas as análises, o software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado. Para análise da morfologia, os escores foram comparados entre todos os tratamentos com o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Os dados referentes à viabilidade foram analisados por meio de ANOVA seguida do teste de Fisher PLSD. Para todos os resultados, foi considerado um valor de significância de $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Com base nas análises da morfologia dos túbulos seminíferos (Tabela 1), o grupo vitrificado foi semelhante ao fresco nos parâmetros de ruptura de membrana (fresco: $2,97 \pm 0,01$ e agulhas: $2,99 \pm 0,01$) e retração de membrana (fresco: $2,93 \pm 0,02$ e agulhas: $2,91 \pm 0,02$). Dessa forma, o método de vitrificação em agulhas mostrou-se eficiente na preservação da integridade da membrana dos túbulos seminíferos. Em relação aos parâmetros de distinção celular, visualização nuclear, condensação nuclear e estrutura, houve uma redução significativa do grupo vitrificado. No entanto,



há evidências de que a criopreservação causa injúrias às células germinativas. Picazo *et al.* (2022), utilizando o método de vitrificação por imersão em agulhas na criopreservação de tecido testicular de cães adultos, relataram que a criopreservação afeta a integridade estrutural dos túbulos, bem como aumenta a incidência de vacuolização e necrose das células germinativas. Esse efeito está relacionado com o grau de distinção entre as células de Sertoli e Espermatogônias, bem como a visualização e o grau de condensação nuclear, que podem ser afetados por essas crioinjúrias.

Teixeira *et al.* (2021), utilizando a técnica de vitrificação em superfície sólida na criopreservação de tecido testicular de cães pré-púberes, evidenciaram que esse método de criopreservação promoveu um maior grau de separação das células da membrana basal. Diante disso, os resultados obtidos no presente trabalho revelam a técnica de vitrificação por imersão em agulhas pode ser mais eficiente na preservação deste parâmetro, uma vez que o grupo vitrificado foi semelhante ao fresco em relação ao grau de retração de membrana.

Tabela 1 - Avaliação morfológica (3, normal a 1, degenerado) de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*) pré-púberes (n=5) fresco vs criopreservado utilizando a técnica de vitrificação por imersão em agulhas.

Tratamento	Retração de Membrana	Ruptura de Membrana	Distinção Celular	Visualização Nuclear	Condensação Nuclear	Estrutura
Fresco	2,97 ± 0,01 ^a	2,93 ± 0,02 ^a	2,60 ± 0,04 ^a	2,78 ± 0,03 ^a	2,69 ± 0,03 ^a	2,94 ± 0,01 ^a
AG	2,99 ± 0,01 ^a	2,91 ± 0,02 ^a	1,75 ± 0,04 ^b	1,90 ± 0,03 ^b	1,75 ± 0,04 ^b	1,99 ± 0,01 ^b

^{ab}Na mesma coluna, diferentes sobrescritos demonstram diferenças significativas (P < 0,05).

Com relação à viabilidade das células presentes no tecido testicular, houve uma redução significativa (P<0,05) da viabilidade do tecido fresco (82,8 ± 3,4) quando comparado ao criopreservado (52,3 ± 4,1). Essa queda da viabilidade é esperada para o tecido criopreservado, uma vez que estudos anteriores revelam que as técnicas de criopreservação afetam a viabilidade do tecido testicular (SILVA *et al.*, 2021). Além disso, Picazo *et al.*, (2022), comparando a vitrificação por imersão em agulhas no tecido testicular de javalis e de cães, evidenciou que o tecido testicular canino apresentou maior sensibilidade à criopreservação, sofrendo danos que afetam a viabilidade celular.



Conclusão

Os resultados encontrados no presente trabalho contribuem para o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de tecido testicular de cães pré-púberes. A vitrificação por imersão em agulhas revela-se como uma técnica promissora, que permite a preservação da integridade de membrana nos túbulos seminíferos, bem como apresenta resultados semelhantes às outras técnicas de vitrificação, tornando-se uma alternativa para a conservação de germoplasma canino. No entanto, estudos comparando as demais técnicas de criopreservação são necessários para que se possa conhecer os efeitos da criopreservação sobre este tecido.

Referências

- ANDRAE, Christopher S., et al. Cryopreservation of grey wolf (*Canis lupus*) testicular tissue. **Cryobiology**, 2021.
- COMIZZOLI P, Holt W. Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. **Reprod. Sci. Anim. Conserv.**, 2014.
- ONOFRE J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. **Hum Reprod Update**, 2016.
- SILVA, Andréia Maria, et al. Influence of freezing techniques and glycerol-based cryoprotectant combinations on the survival of testicular tissues from adult collared peccaries. **Theriogenology**, 2021.
- TEIXEIRA, Diego Oliveira, et al. Avaliação histológica dos testículos de cães pré-púberes submetidos à vitrificação com diferentes associações de crioprotetores. **Research, Society and Development**, 2021.
- THUWANUT, Paweena, et al. Sperm quality and the morphology of cryopreserved testicular tissues recovered post-mortem from diverse wild species. **Cryobiology**, 2013.
- WANG Y., Xiao Z., Li L., Fan W. & Li S.W. 2008. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. **Hum Reprod**, 2008.
- XIAO, Zhun, et al. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. **Fertility and sterility**, 2010.
- YOKONISHI, T. et al. Offspring production with sperm grown *in vitro* from cryopreserved testis tissues. **Nature Communications**, v.5, p.1-6, 2014.



VIABILIDADE DO SÊMEN BUBALINO RESFRIADO E CRIOPRESERVADO EM TES-TRIS COM GEMA DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E DE PATA (*Anas platyrhynchos*)

VIABILITY OF CHILLED AND CRYOPRESERVED BUBALINE SEMEN IN TES-TRIS WITH CHICKEN (*Gallus gallus domesticus*) AND DUCK (*Anas platyrhynchos*) YOLK

André de Medeiros Costa LINS^{1*}; Adriana Novaes dos REIS²; Lílian Kátia Ximenes SILVA²; Aluizio Otávio Almeida da SILVA²; Lauro Nogueira BARBOSA NETO³; Juliana Gonçalves LIMA⁴; Janayna Barroso dos SANTOS⁴

¹Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal na Amazônia – ReproAmazon, Universidade Federal do Pará – UFPA, Castanhal, Pará, Brasil; ²Central de Biotecnologia de Reprodução Animal – CEBRAN, Universidade Federal do Pará - UFPA, Castanhal, Pará, Brasil; ³Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará - UFPA, Castanhal, Pará, Brasil; ⁴Programa de Residência em Clínica Médica e Reprodução Animal, Universidade Federal do Pará - UFPA, Castanhal, Pará, Brasil; ⁵Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal na Amazônia – PPGSAAM, Universidade Federal do Pará - UFPA, Castanhal, Pará, Brasil.

*E-mail: andre.lins@ufpa.castanhal.ufpa.br

Abstract

The use of chilled semen is an alternative to increase the pregnancy rate in artificial insemination (AI) of buffaloes, but it still requires further elucidation regarding its use, such as new diluents and time of sperm viability. In this sense, 6 ejaculates were collected from 4 bulls with the objective of comparing the viability of bubaline semen diluted with TES-TRIS in two concentrations of yolk (10 and 20%) of chicken (*Gallus gallus domesticus* - 10 GG and 20 GG) and duck (*Anas platyrhynchos* - 10 GP and 20 GP) submitted to different refrigeration times (24, 48 and 72 h) and cryopreservation after 24 h of refrigeration. The values obtained were submitted to ANOVA and Tukey's test at 5% probability. There was a difference between diluents with 10% and 20% yolk ($p < 0.05$), being the sperm motility in samples 10 GG (62.83 ± 18.42 and 52.00 ± 20.73) and 10 GP (63.83 ± 16.78 and 50.17 ± 19.79) higher in 24 h and 48 h, compared to dilutions with 20 GG (50.00 ± 24.22 and 39.00 ± 22.38) and 20 GP (56.83 ± 19.09 and 45.00 ± 18.18). In semen chilled for 24 h and cryopreserved there was significant difference ($p < 0.05$) in all parameters over time (0 and 24 h). It was concluded that the semen chilled with 10 GG and 10 GP diluent presented the best results, besides that with the cryopreservation after 24 h of refrigeration the sperm viability was maintained.

Keywords: dilution, cryopreservation, spermatozoa, buffaloes.

Introdução

As biotecnologias reprodutivas contribuem para o melhoramento genético, onde a inseminação artificial (IA) possui aplicação de forma rotineira. A difusão da IA está relacionada a criopreservação, mas, sabe-se que a mesma ocasiona danos celulares e perda da viabilidade espermática (BARUSELLI *et al.*, 2018; NEGLIA *et al.*, 2020). Nesse sentido, o emprego do sêmen refrigerado pode aumentar o tempo de sobrevivência dos espermatozoides e consequentemente a



taxa de prenhez (SILVA *et al.*, 2017; BRITO *et al.*, 2018), inclusive para bubalinos (ALMEIDA *et al.*, 2016), devido principalmente a menor exposição a injúrias (BORGES-SILVA *et al.*, 2015; BUCHER *et al.*, 2009). Entretanto, a refrigeração precisa elucidar pontos, como: custo-benefício; padronização; tempo de viabilidade espermática; diluidor mais indicado; logística de distribuição e taxa de prenhez (SILVA *et al.*, 2019).

A gema de galinha é a mais utilizada na composição dos diluentes, por ser de mais fácil aquisição e de baixo custo (BATHGATE; MAXWELL; EVANS, 2006). Geralmente a gema de galinha é acrescentada aos diluentes em concentração de 20% (MANJUNATH, 2012), especialmente no TES-TRIS (REIS *et al.*, 2017). Porém, trabalhos demonstraram que a gema de pata contribui significativamente para a viabilidade do sêmen de búfalos (RAWASH *et al.*, 2020; WAHEED; AHMAD; JAMIL-UR-RAHMAN, 2012), aumentando a fertilidade *in vivo* (EL-SHARAWY *et al.*, 2015). A gema de pata apresenta maior proporção de ácidos graxos monoinsaturados e fosfatidilinositol, e menor de colesterol (BATHGATE; MAXWELL; EVANS, 2006), o que é importante para proteger os espermatozoides em baixas temperaturas (LADBROOKE; WILLIAMS; CHAPMAN, 1968).

Nos trabalhos que envolvem análise do sêmen refrigerado de bubalinos, alguns diluentes possuem maior uso, como o TES (ALMEIDA *et al.*, 2016), TRIS e o BotuBoy® (ALMEIDA, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2020). Não existem relatos do diluidor TES-TRIS utilizando gema de pata na refrigeração do sêmen bubalino e nem da criopreservação após 24 h de refrigeração. Diante disso, objetivou-se comparar a viabilidade do sêmen bubalino diluído com TES-TRIS em duas concentrações de gema (10 e 20%) de galinha (*Gallus gallus domesticus*) e de pata (*Anas platyrhynchos*) submetido a diferentes tempos de refrigeração (24, 48 e 72 h) e a criopreservação após 24 h de refrigeração.

Material e métodos

O experimento foi realizado na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN-UFPA), em Castanhal/PA. Foram utilizados 4 touros bubalinos clinicamente e andrologicamente saudáveis, sendo realizadas 3 colheitas semanais por vagina artificial adaptada aos bubalinos (VALE, 2011; VALE *et al.*, 1984), com um total de 6 ejaculados por animal (24 amostras). Após a colheita, o sêmen foi submetido a análise da motilidade, vigor e integridade da



membrana plasmática, através do teste hiposmótico (HOST) (REIS *et al.*, 2017). Somente as amostras com parâmetros recomendados pelo CBRA (2013) foram utilizadas.

O sêmen foi diluído com TES-TRIS variando a fonte e percentual de adição de gema: 10 e 20% de gema de galinha (10 GG e 20 GG) e 10 e 20% de gema de pata (10 GP e 20 GP). Foram envasadas 36 doses (20×10^6 espermatozoides/mL) de cada touro, sendo 9 por grupo. Em seguida, as amostras foram submetidas a diferentes tempos de refrigeração (24, 48 e 72 h) à 5°C. Foram envasadas 12 doses de cada touro com os diferentes diluentes (3 por grupo), refrigeradas por 24 h e criopreservadas. As doses foram aquecidas ou descongeladas a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo software BioEstat 5.3* e as diferenças entre as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A média de motilidade (85.24 ± 5.12) e vigor (3.9 ± 0.30) no sêmen “in natura” apresentou-se dentro da normalidade (CBRA, 2013; VALE, 2011), sendo superior as de SILVA *et al.* (2020) e semelhante as de REIS *et al.* (2015). Sabe-se que variações seminais em bubalinos são frequentes e relacionam-se a individualidade, sazonalidade, clima, horário, período de repouso sexual e método de colheita (ALMEIDA, 2018; HENRY *et al.*, 2017).

Comparando-se os protocolos de refrigeração houve diminuição nos parâmetros ao longo do tempo ($p < 0,05$) (Tabela 1). Em relação a redução da motilidade espermática durante a refrigeração há relatos de outros autores (ALMEIDA *et al.*, 2020; BECERRA, 2017; SINGH *et al.*, 2012). Além disso, no presente estudo, observou-se menor motilidade nas amostras diluídas com 20 GG e 20 GP após 24 e 48 h de refrigeração, mas mantiveram-se dentro da normalidade (CBRA, 2013). Com base nos resultados seria recomendado utilizar sêmen refrigerado por até 48 h, como sugerido por ALMEIDA (2018), pois após 72 h há maior redução da motilidade, como relatado por SINGH *et al.* (2017) e BECERRA (2017). Além disso, não se justifica o uso do sêmen refrigerado por tempo superior a 48 h em búfalos condicionados à colheita com vagina artificial, o que poderia reduzir a taxa de prenhez (ALMEIDA, 2018).

Tabela 1 - Avaliação do sêmen bubalino refrigerado em diferentes tempos e diluidores.



Parâmetros	Tempo	10 GG	10 GP	20 GG	20 GP
Motilidade (%)	0 h	75.50 ± 5.94 ^{Aa}	77.00 ± 4.62 ^{Aa}	74.00 ± 5.88 ^{Aa}	75.50 ± 5.02 ^{Aa}
		62.83 ±	63.83 ±	50.00 ±	56.83 ±
	24 h	18.42 ^{Ab}	16.78 ^{Ab}	24.22 ^{Bb}	19.09 ^{ABb}
		52.00 ±			45.00 ±
	48 h	20.73 ^{Ab}	50.17 ± 19.79 ^{Ac}	39.00 ± 22.38 ^{Bc}	18.18 ^{Abc}
		34.83 ±			
	72 h	34.33 ± 17.01 ^{Ac}	18.36 ^{Ad}	25.27 ± 15.96 ^{Ac}	29.67 ± 18.22 ^{Ac}
Vigor (1 a 5)	0 h	3.70 ± 0.46 ^{Aa}	3.65 ± 0.48 ^{Aa}	3.5 ± 0.50 ^{Aa}	3.5 ± 0.50 ^{Aa}
	24 h	2.83 ± 0.64 ^{Ab}	2.95 ± 0.39 ^{Ab}	3.35 ± 1.07 ^{Ab}	2.68 ± 0.65 ^{Ab}
	48 h	2.55 ± 0.98 ^{Abc}	2.55 ± 0.87 ^{Abc}	2.23 ± 0.95 ^{Abc}	2.4 ± 0.74 ^{Abc}
	72 h	2.22 ± 0.92 ^{Ac}	2.30 ± 0.81 ^{Ac}	1.73 ± 0.86 ^{Ac}	2.08 ± 1.00 ^{Ac}
	0 h	82.45 ± 10.14 ^{Aa}	82.45 ± 10.14 ^{Aa}	82.45 ± 10.14 ^{Aa}	82.45 ± 10.14 ^{Aa}
Integridade Membrana (%)		67.50 ±	67.20 ±	62.87 ±	
	24 h	16.58 ^{Ab}	16.51 ^{Ab}	14.70 ^{Ab}	61.08 ± 17.21 ^{Ab}
		62.77 ±	60.48 ±	62.77 ±	57.07 ±
	48 h	16.51 ^{Abc}	14.57 ^{Abc}	14.76 ^{Abc}	14.87 ^{Abc}
	72 h	54.65 ± 15.23 ^{Ac}	52.23 ± 15.13 ^{Ac}	53.30 ± 14.71 ^{Ac}	50.20 ± 16.84 ^{Ac}

^{A,B} Letras distintas indicam diferença estatística nas médias das linhas ($p < 0,05$).

^{a,b,c,d} Letras distintas indicam diferença estatística nas médias das colunas ($p < 0,05$).

Sabe-se que a redução na motilidade e vigor, ao longo do tempo possui relação com a peroxidação lipídica, que reduz a quantidade de fosfolípidios de membrana podendo alterar sua composição, viabilidade e capacidade de fusão com o oócito (HERMIER, 1999).

No estudo observou-se que em várias amostras houve a formação de grumos nos diluentes com 20% de gema, especialmente gema de galinha, após 48 h de refrigeração, com visibilidade quase nula às 72 h. Constatou-se espermatozoides aderidos a esses grumos, tornando-os inviáveis. SINGH *et al.* (2012) afirmam que a visibilidade espermática diminui em meio diluidor com maior concentração lipídica, interferindo na avaliação do sêmen e diminuindo seu movimento (MOUSSA *et al.*, 2002), o que provavelmente explica a redução da motilidade espermática do sêmen diluído e refrigerado com 20% de gema.



A integridade da membrana plasmática apresentou redução ao longo dos diferentes tempos de refrigeração, o que também foi detectado por ALMEIDA *et al.*, 2020; BECERRA, 2017 e SINGH *et al.*, 2017. No entanto, não foi observada diferença entre os meios diluidores (GG e GP). Além disso, as médias observadas foram inferiores aos relatados por ALMEIDA (2018), com valores de 90% (0 h), 83% (24 h), 75% (48 h) e 68% (72 h); e, superiores aos de SINGH *et al.* (2012), 73% (0 h), 48% (24 h), 37% (48 h) e 25% (72 h).

As doses submetidas à refrigeração por 24 h seguida de criopreservação apresentaram diferença significativa em todos os parâmetros ao longo de tempo (0 e 24 h) (Tabela 2). Ressalta-se que mesmo após a refrigeração e criopreservação as amostras apresentaram valores de motilidade e vigor superiores aos recomendados pelo CBRA (2013), sendo exceção o diluente 20 GG. O sêmen criopreservado após 24 h de refrigeração manteve a integridade de membrana plasmática, sendo as médias encontradas semelhantes (49.93 ± 7.90) a de REIS *et al.*, (2017), somente com criopreservação utilizando TES-TRIS com 20% de gema de galinha.

Tabela 2 - Avaliação do sêmen bubalino refrigerado por 24 h e submetido a criopreservação.

Parâmetros	Tempo/Método	10 GG	10 GP	20 GG	20 GP
Motilidade (%)	0 h/Diluído	75.50 ±	77.00 ±	74.00 ±	75.50 ±
		5.94 ^{aa}	4.62 ^{aa}	5.88 ^{aa}	5.02 ^{aa}
	24 h/Refrigerado	62.83 ±	63.83 ±	50.00 ±	56.83 ±
		18.42 ^{ab}	16.78 ^{ab}	24.22 ^{bb}	19.09 ^{abb}
	24 h/Refrigerado e Criopreservado	35.33 ±	35.83 ±	25.95 ±	29.75 ±
		21.43 ^{ac}	21.34 ^{ac}	19.94 ^{ac}	21.90 ^{ac}
Vigor (1 a 5)	0 h/Diluído	3.70 ±	3.65 ±	3.5 ±	3.5 ± 0.50 ^{aa}
		0.46 ^{aa}	0.48 ^{aa}	0.50 ^{aa}	
	24 h/Refrigerado	2.83 ±	2.95 ±	3.35 ±	2.68 ±
		0.64 ^{ab}	0.39 ^{ab}	1.07 ^{ab}	0.65 ^{ab}
	24 h/Refrigerado e Criopreservado	2.05 ±	2.25 ±	1.77 ±	2.05 ±
		0.98 ^{ac}	0.79 ^{ac}	1.01 ^{ac}	0.83 ^{ac}
Integridade Membrana (%)	0 h/Diluído	82.45 ±	82.45 ±	82.45 ±	82.45 ±
		10.14 ^{aa}	10.14 ^{aa}	10.14 ^{aa}	10.14 ^{aa}
	24 h/Refrigerado	67.50 ±	67.20 ±	62.87 ±	61.08 ±
		16.58 ^{ab}	16.51 ^{ab}	14.70 ^{ab}	17.21 ^{ab}



24 h/Refrigerado e	53.87 ±	50.72 ±	50.77 ±	50.02 ±
Criopreservado	14.71 ^{ac}	14.43 ^{ac}	12.83 ^{ac}	14.02 ^{ac}

^{a,b} Letras distintas indicam diferença estatística nas médias das linhas ($p < 0,05$).

^{a,b,c} Letras distintas indicam diferença estatística nas médias das colunas ($p < 0,05$).

Conclusão

Conclui-se que o sêmen refrigerado com diluidor 10 GG e 10 GP apresentou melhor resultado em relação a motilidade e visibilidade espermática. Além disso, com a criopreservação após 24 h de refrigeração é mantida a viabilidade espermática, podendo ser alternativa para conservação de sêmen bubalino.

Referências

- BARUSELLI, P.S. et al. Assisted reproductive technologies (ART) in water buffaloes. **Animal Production**, v.15, n.1, p.971–983, 2018.
- BRITO, M.F. et al. Low density lipoproteins at 2 % concentration can replace whole egg yolk in TES-Tris-Milk extender for freezing buffalo sperm cells. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.46, p.1–6, 2018.
- NEGLIA, G. et al. Theriogenology reproductive management in buffalo by artificial insemination. **Theriogenology**, v.150, p.166–172, 2020.
- RAWASH, Z.M. et al. Influence of combinations of some permeable cryoprotectants with chicken and duck egg yolks on freezability and DNA Integrity of buffalo spermatozoa. **Journal of Applied Veterinary Sciences**, v.5, n.3, p.49–56, 2020.
- REIS, A. N. DOS et al. Comparative evaluation between the extenders TES-TRIS and ACP- 112 ® and the association of Sálva Marajó oil (*Lippia origanoides*) in the quality of cryopreserved buffalo sperm Avaliação comparativa entre os diluidores TES-TRIS e ACP-112 ® e a associação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 6, p. 3613–3628, 2017.
- SILVA, L. K. X. et al. Increased quality of in natura and cryopreserved semen of water buffaloes supplemented with saturated and unsaturated fatty acids from the palm oil industry. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 4, p. 1–17, 2020.



VITRIFICAÇÃO DE TECIDO TESTICULAR DE CÃES (*Canis lupus familiaris*) PRÉ-PÚBERES UTILIZANDO CRIOTUBOS E SUPERFÍCIE SÓLIDA

VITRIFICATION OF TESTICULAR TISSUE OF PREPUBERTAL DOGS (*Canis lupus familiaris*) USING CRYOVIALS OR SOLID SURFACE

Ana Glória PEREIRA^{1*}; Andréia Maria da SILVA¹; Luana Grasielle Pereira BEZERRA¹; Náyra Rachel Nascimento LUZ¹; Tainá Moura MATOS¹; Thales Pinheiro Cavalcanti BEZERRA²; Alexandre Rodrigues SILVA¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Rua Francisco Mota, 572 - Pres. Costa e Silva, Mossoró - RN, 59625-900.

²Universidade de Fortaleza – UNIFOR, Av. Washington Soares - Edson Queiroz, Fortaleza - CE, 60811-905

*E-mail: anagloriavet@gmail.com

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effects of cryovials and solid surface vitrification methods on the conservation of testicular tissue from prepubertal dogs. For this purpose, five pairs of testes from males aging between 3 and 6 months were collected. The testes were fragmented and vitrified using both methods. Based on the analysis of seminiferous tubule morphology, both vitrification methods were efficient in preserving the integrity of the basement membrane. Samples submitted to cryovial vitrification showed significantly higher values ($P < 0.05$) for the parameters of cell distinction (2.10 ± 0.04), nuclear visualization (2.11 ± 0.04), nuclear condensation (1.86 ± 0.02) and structure (2.28 ± 0.04) when compared to solid surface vitrification methods (cell distinction: 1.77 ± 0.04 ; nuclear visualization: 1.76 ± 0.05 ; nuclear condensation: 1.66 ± 0.05 and structure: 2.06 ± 0.05). Regarding testicular tissue viability, despite vitrified samples presented a lower viability than that observed for fresh group ($83 \pm 3.27\%$), the samples cryopreserved by cryovials vitrification ($41.8 \pm 5.42\%$) presented cell viability similar to solid surface ($51.8 \pm 3.80\%$). Based on the morphological analysis, we suggest the use of vitrification in cryotubes is suggested for the preservation of testicular tissue derived from prepubertal dogs.

Keywords: Cryopreservation, Germplasm, Reproduction.

Introdução

Entre os canídeos, há muitas espécies ameaçadas de extinção. O lobo da etiópia (*Canis simensis*) é considerado o canídeo mais ameaçado da África (GOTTELLI *et al.*, 1994). No Brasil, o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) e o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) são considerados vulneráveis na lista de animais ameaçados da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). A sobrevivência destas espécies depende da preservação da biodiversidade existente. Para tanto, os cães domésticos (*Canis familiaris*) podem ser utilizados como modelos experimentais para a conservação do germoplasma de canídeos.



O tecido testicular contém espermatogônias, células que dão origem aos espermatozoides por meio do processo de espermatogênese. A conservação do tecido testicular pode ser realizada por diversos métodos de criopreservação, como por exemplo a vitrificação, que se apresenta como uma boa alternativa para o estabelecimento de protocolos de conservação do germoplasma de espécies ameaçadas. No entanto, a literatura cita diferentes métodos de vitrificação como aquele utilizando-se criotubos (LIMA *et al.*, 2018) ou a superfície sólida (TEIXEIRA *et al.*, 2021), sendo então necessário se estabelecer um protocolo eficiente a ser aplicado em cães pré-púberes. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da vitrificação em criotubos e em superfície sólida sobre a preservação da morfologia e viabilidade de células provenientes do tecido testicular de cães pré-púberes.

Material e métodos

Foram coletados cinco pares de testículos de cães machos, de 3 a 5 meses de idade. Cada par de testículos foi dividido em fragmentos de 3mm³, dos quais dois fragmentos foram imediatamente fixados em bouin, para análise morfológica por histologia clássica e análise da viabilidade celular por meio de microscopia de fluorescência. Os demais fragmentos foram imersos em duas soluções contendo os crioprotetores dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol (EG). A primeira solução, constituída de DMEM acrescido de 0,25 M de sacarose, 10% de SFB (Soro Fetal bovino) e 1,4 M de cada crioprotetor, foi considerada uma solução de equilíbrio. A solução de vitrificação foi constituída de DMEM acrescido de 0,5 M de sacarose, 10% de SFB e 2,8M de cada crioprotetor. Os fragmentos foram imersos 10 minutos em solução de equilíbrio e 5 minutos na solução de vitrificação. Em seguida, serão enxutos com gaze e submetidos a vitrificação. Para a vitrificação em criotubos, os fragmentos foram colocados em criotubos previamente identificados e, em seguida, imersos em nitrogênio líquido (LIMA *et al.*, 2018). Na vitrificação em superfície sólida foi colocada uma superfície metálica em contato com nitrogênio líquido. Ao entrar em contato com a superfície os fragmentos eram vitrificados. Em seguida, foram transferidos para criotubos e colocados em nitrogênio líquido (TEIXEIRA *et al.*, 2021). Após uma semana de armazenamento, os fragmentos foram descongelados a 37 °C, removendo-se os crioprotetores em banhos consecutivos em soluções com concentrações decrescentes de sacarose (0,5M; 0,25M e 0,0M).



As amostras a fresco e vitrificadas foram analisadas quanto à morfologia por meio do processamento para histologia clássica, seguindo-se da análise em microscopia de luz. Foram analisados 30 túbulos seminíferos, de acordo com a integridade e o grau de separação da membrana basal, distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, visualização nuclear, condensação nuclear e organização estrutural do túbulo. A avaliação foi feita por meio de escores de 1 a 3, onde 3 representa o melhor resultado, com a preservação de todas as estruturas analisadas e organização celular, e 1 indica comprometimento dos parâmetros avaliados (SILVA *et al.*, 2021). Para análise da viabilidade, as células testiculares foram isoladas por meio de um protocolo de digestão enzimática utilizando-se a colagenase e, em seguida, marcadas utilizando-se as sondas fluorescentes iodeto de propídio (0,5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato e PBS) e 3 µL de Hoechst 33342 (40 mg/mL em PBS) durante 10 min a 37 ° C. Um total de 100 células foram contadas e classificadas como inviável (fluorescência vermelha; iodeto de propídio) ou viável (fluorescência azul; Hoechst 33342) (SILVA *et al.*, 2021).

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. Para todas as análises, o software Statview 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) foi utilizado. Para análise da morfologia, os escores foram comparados entre todos os tratamentos com o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney para amostras independentes. Os dados referentes à viabilidade foram analisados por meio de ANOVA seguida do teste de Fisher PLSD. Para todos os resultados, foi considerado um valor de significância de $P < 0,05$.

Resultados e discussão

Com base nas análises da morfologia dos túbulos seminíferos (Tabela 1), todos os métodos de vitrificação foram eficientes na preservação da integridade da membrana basal. No tocante à distinção entre espermatogônias e células de Sertoli, bem como a visualização e condensação nuclear, além da estrutura dos túbulos seminíferos, houve uma redução significativa ($P < 0,05$) desses parâmetros nos grupos vitrificados, quando comparados ao fresco. Picazo *et al.* (2022) relataram que a criopreservação afeta a integridade estrutural dos túbulos, bem como aumenta a incidência de vacuolização e necrose das células germinativas.

As amostras submetidas à vitrificação em criotubos apresentaram resultados significativamente maiores nos parâmetros de distinção celular ($2,10 \pm 0,04$), visualização nuclear



($2,11 \pm 0,04$), condensação nuclear ($1,86 \pm 0,02$) e estrutura ($2,28 \pm 0,04$) quando comparados aos métodos de vitrificação em superfície sólida (distinção celular: $1,77 \pm 0,04$; visualização nuclear: $1,76 \pm 0,05$; condensação nuclear: $1,66 \pm 0,05$ e estrutura: $2,06 \pm 0,05$).

Tabela 1 - Avaliação morfológica (3, normal a 1, degenerado) de tecido testicular de cães (*Canis lupus familiaris*) pré-púberes (n=5) fresco vs criopreservado utilizando as técnicas de vitrificação convencional e vitrificação em superfície sólida.

Tratamento	Retração de Membrana	Ruptura de Membrana	Distinção Celular	Visualização Nuclear	Condensação Nuclear	Estrutura
Fresco	$2,97 \pm 0,01^a$	$2,93 \pm 0,02^a$	$2,60 \pm 0,04^a$	$2,78 \pm 0,03^a$	$2,69 \pm 0,03^a$	$2,94 \pm 0,01^a$
Superfície Sólida	$2,98 \pm 0,01^a$	$2,97 \pm 0,01^a$	$1,77 \pm 0,04^a$	$1,76 \pm 0,05^a$	$1,66 \pm 0,05^a$	$2,06 \pm 0,05^a$
Criotubos	$2,94 \pm 0,01^a$	$2,92 \pm 0,02^a$	$2,10 \pm 0,04^a$	$2,11 \pm 0,04^a$	$1,86 \pm 0,02^a$	$2,28 \pm 0,04^a$

^{abc}Na mesma coluna, diferentes sobrescritos demonstram diferenças significativas ($P < 0,05$).

Em relação à viabilidade das células isoladas do tecido testicular, todas as amostras submetidas ao procedimento de vitrificação sofreram uma redução significativa, quando comparadas ao grupo fresco ($83 \pm 3,27\%$). As amostras criopreservadas por vitrificação em criotubos ($41,8 \pm 5,42\%$) e superfície sólida ($51,8 \pm 3,80\%$) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$).

Ao nosso conhecimento, esta é a primeira vez que a técnica de vitrificação em criotubos é utilizada na criopreservação do tecido testicular de cães pré-púberes, sendo que a técnica de vitrificação em superfície sólida já havia sido testada tanto para o tecido testicular canino tanto de animais adultos (CARVALHO, 2016) como pré-púberes (TEIXEIRA *et al.*, 2021). Inclusive, estes últimos autores haviam sugerido que a associação dos crioprotetores DMSO e EG foi eficiente na preservação da estrutura tubular, distinção celular e visualização nuclear das amostras vitrificadas. Esta mesma associação foi utilizada no presente trabalho, tanto na vitrificação em superfície sólida, como em criotubos, apresentando resultados que indicam uma boa eficiência da associação destes crioprotetores na preservação dos parâmetros morfológicos do tecido testicular, bem como da viabilidade das células germinativas após a criopreservação.



Nossos resultados demonstram que a vitrificação em criotubos apresenta vantagem sobre a vitrificação em superfície sólida no tocante à conservação da morfologia do tecido testicular criopreservado, mas com similar preservação da viabilidade celular. SILVA *et al.* (2021), comparando o uso da vitrificação em criotubos e da superfície sólida na criopreservação de tecido testicular de catetos (*Pecari tajacu*), obtiveram resultados positivos na conservação da morfologia do tecido com a utilização da vitrificação em criotubos, sugerindo que esta técnica permitiria uma melhor adequação do tecido às mudanças de temperatura oriundas do processo de vitrificação.

Conclusão

Sugere-se o uso da vitrificação em criotubos para a preservação da morfologia e viabilidade celular no tecido testicular de cães pré-púberes. Esta técnica, aparentemente, possibilita a manutenção da integridade das células germinativas, como as espermatogônias, que são responsáveis pela produção de espermatozoides, contribuindo para a preservação de germoplasma masculino de canídeos.

Referências

- CARVALHO, Maria da Conceição. Criopreservação de Tecido Testicular de Cães Avaliação Histológica e Ultraestrutural. **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.
- SILVA, Andréia Maria, et al. Influence of freezing techniques and glycerol-based cryoprotectant combinations on the survival of testicular tissues from adult collared peccaries. **Theriogenology**, 2021.
- GOTTELLI, D et al. Molecular genetics of the most endangered canid: The Ethiopian Wolf *Canis Simensis*. **Mol Ecol**, v.3, p.301-12, 1994.
- LIMA DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, Leiva-Revilla J, Silva LDM. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. **Theriogenology**, 2018.
- TEIXEIRA, Diego Oliveira, et al. Avaliação histológica dos testículos de cães pré-púberes submetidos à vitrificação com diferentes associações de crioprotetores. **Research, Society and Development**, 2021.

XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL



ANAIS DO XI CONGRESSO NORTE E NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL (XI CONERA)

11ª EDIÇÃO

Wissen Editora

www.editorawissen.com.br

contato@wisseneditora.com.br

wisseneditora@gmail.com

Instagram: @wisseneditora

Teresina – PI, Brasil.

