

## Existe efeito de programação fetal na prole subsequente de machos da raça Nelore sobre a funcionalidade de membrana mitocondrial, ao realizar desmame antecipado e convencional em fêmeas primíparas e múltíparas?

Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes Arruda<sup>1\*</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>2</sup>, Júlio Cesar de Carvalho Balieiro<sup>3</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>5</sup>, Paulo Roberto Leme<sup>6</sup>, Germán Darío Ramirez Zamudio<sup>6</sup>, Giovanna Galhardo Ramos<sup>1</sup>, Thiago Kan Nishimura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil;

<sup>4</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil

<sup>5</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPaR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo - USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>6</sup>Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brasil

\*E-mail: arrudarp@usp.br

Programação fetal refere-se ao conceito no qual fatores que afetam a saúde e o desempenho da mãe gestante podem ter efeitos a longo prazo na prole, por meio de estímulo ou lesão durante períodos críticos da gestação os quais modulam o desenvolvimento fetal e interferem no desempenho da progênie. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do desmame antecipado e convencional sobre a oxidação do citocromo C de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), a qual caracteriza a funcionalidade da membrana mitocondrial, da prole subsequente de machos, gerada por fêmeas primíparas ou múltíparas. Foram avaliados 56 machos da raça Nelore, com idade média inicial de 12,5 meses. Durante o desenvolvimento fetal destes animais, suas mães, primíparas ou múltíparas, desmamaram bezerras com 150 ou 240 dias (desmame antecipado ou convencional, respectivamente). Desta forma, dos 56 animais que foram utilizados, 29 são provenientes de fêmeas primíparas, sendo 14 do grupo desmame antecipado e 15 do desmame convencional. Os outros 27 animais foram gerados por fêmeas múltíparas, sendo 13 pertencentes ao grupo desmame antecipado e 14 do desmame convencional. As colheitas de sêmen aconteceram aos 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, utilizando a técnica de eletroejaculação. A funcionalidade da membrana mitocondrial foi avaliada pelo teste ultracitoquímico de atividade *in situ* da citocromo C oxidase. Para isso, foi utilizada uma alíquota de 80 µL de sêmen incubada com 80 µL de DAB (diaminobenzidina - 1 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco – DPBS) a 37°C durante uma hora. Após a incubação, foram realizados três esfregaços, os quais foram fixados em formol a 10% durante 10 minutos. As lâminas foram secas no ar sob proteção da luz e depois avaliadas sob microscopia óptica com aumento de 1000x. Foram avaliadas 200 células por amostra e classificadas em quatro classes: DAB I: espermatozoides com peça intermediária totalmente corada, com praticamente todas as mitocôndrias ativas, indicando alta atividade mitocondrial. DAB II: espermatozoides com mais da metade das mitocôndrias coradas, indicando atividade mitocondrial média a alta. DAB III: espermatozoides com menos da metade das mitocôndrias coradas, indicando baixa atividade mitocondrial. DAB IV: espermatozoides com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondria. Os resultados foram expressos em porcentagem de cada subpopulação na amostra. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS (Versão 9.2; SAS Institute), analisados por meio de ANOVA utilizando modelo misto (PROC MIXED). Quando detectado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo método de Fisher de menor diferença significativa para múltiplas comparações. Foram considerados como diferença significativa quando  $P \leq 0,05$ . Não houve efeito de desmame, mãe, nem interação entre desmame, mãe e idade ( $p > 0,05$ ). Entretanto, houve efeito de idade para potencial de membrana mitocondrial ( $p < 0,01$ ), sendo os dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média: DAB I:  $40,7^c \pm 3,6$ ,  $62,9^b \pm 2,6$ ,  $70,4^a \pm 2,3$  e  $70,3^a \pm 2,1$ ; DAB II:  $39,6^a \pm 2,8$ ,  $28,3^b \pm 2,1$ ,  $21,6^c \pm 1,8$  e  $26,4^{bc} \pm 1,6$ ; DAB III:  $9,7^a \pm 0,9$ ,  $2,2^b \pm 0,7$ ,  $1,6^b \pm 0,6$  e  $1,1^b \pm 0,5$ ; DAB IV:  $13,6^a \pm 1,8$ ,  $6,6^b \pm 1,4$ ,  $6,5^b \pm 1,2$  e  $2,3^c \pm 1,1$  quando avaliados em 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, respectivamente. Os resultados do presente estudo demonstram que realizar o desmame de forma antecipada ou convencional, utilizando duas classes de mães, não promove efeitos sobre a funcionalidade da membrana mitocondrial da prole de machos da raça Nelore. Entretanto, ao avaliar os espermatozoides de animais da raça Nelore, na fase de pré-púberes e púberes, foi possível observar que conforme os animais vão aumentando a idade, a funcionalidade da membrana mitocondrial torna-se melhor. Conclui-se que não houve efeito de programação fetal ao utilizar o desmame antecipado e convencional na prole subsequente de machos da raça Nelore, gerada por mães primíparas ou múltíparas, porém a funcionalidade da membrana mitocondrial adquire maior qualidade, à medida que os machos da raça Nelore vão se tornando mais velhos.

**Palavras-Chave:** Bovinos, DAB, Nelore.

**Agradecimento:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2017/18937-0).

## Is there a fetal programming effect in subsequent offspring of Nelore males on mitochondrial membrane functionality, when early and conventional weaning is performed in primiparous and multiparous females?

Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes Arruda<sup>1\*</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>2</sup>, Júlio Cesar de Carvalho Balieiro<sup>3</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>5</sup>, Paulo Roberto Leme<sup>6</sup>, Germán Darío Ramirez Zamudio<sup>6</sup>, Giovanna Galhardo Ramos<sup>1</sup>, Thiago Kan Nishimura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Semen Biotechnology and Andrology Laboratory – LBSA, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>2</sup>Molecular Physiology and Endocrinology Laboratory – LFEM, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>3</sup>Department of Animal Nutrition and Production – VNP, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>4</sup>Animal Reproduction Laboratory, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brazil; <sup>5</sup>Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>6</sup>Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brazil  
\*E-mail: arrudarp@usp.br

Fetal programming refers to the concept in which factors that affect the health and performance of the pregnant mother can have long-term effects on the offspring, through stimulation or injury during critical periods of gestation, which modulate fetal development and interfere with the performance of the offspring. The aim of this study was to evaluate the effect of early and conventional weaning on cytochrome C oxidation of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), which characterizes the functionality of the mitochondrial membrane, in subsequent male offspring generated by primiparous or multiparous females. Fifty-six Nelore males were evaluated, with an average initial age of 12.5 months. During the fetal development of these animals, their primiparous or multiparous mothers weaned calves at 150 or 240 days (early or conventional weaning, respectively). Thus, of the 56 animals used, 29 came from primiparous females, 14 from the early weaning group and 15 from conventional weaning. The other 27 animals came from multiparous females, 13 from the early weaning group and 14 from conventional weaning. Semen was collected at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, using the electroejaculation technique. The functionality of the mitochondrial membrane was assessed by the ultracytochemical test of in situ cytochrome C oxidase activity. For this, an aliquot of 80 µL of semen incubated with 80 µL of DAB (diaminobenzidine - 1 mg/mL in Dulbecco's phosphate buffered saline - DPBS) at 37°C for one hour was used. After incubation, three smears were taken and fixed in 10% formaldehyde for 10 minutes. The slides were air-dried under protection from light and then evaluated under light microscopy at 1000x magnification. Two hundred cells were evaluated per sample and classified into four classes: DAB I: sperm with a fully stained midpiece, with practically all the mitochondria active, indicating high mitochondrial activity. DAB II: sperm with more than half of the mitochondria stained, indicating medium to high mitochondrial activity. DAB III: sperm with less than half of the mitochondria stained, indicating low mitochondrial activity. DAB IV: sperm with the middle part completely unstained, indicating no mitochondrial activity. The results were expressed as a percentage of each subpopulation in the sample. Statistical analyses were carried out using SAS software (Version 9.2; SAS Institute), analyzed by ANOVA using a mixed model (PROC MIXED). When a significant treatment effect was detected, the means were compared using Fisher's method of least significant difference for multiple comparisons. A significant difference was considered when  $P \leq 0.05$ . There was no effect of weaning, mother, or interaction between weaning, mother and age ( $p > 0.05$ ). However, there was an age effect for mitochondrial membrane potential ( $p < 0.01$ ), with the data expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean: DAB I:  $40.7^c \pm 3.6$ ,  $62.9^b \pm 2.6$ ,  $70.4^a \pm 2.3$  and  $70.3^a \pm 2.1$ ; DAB II:  $39.6^a \pm 2.8$ ,  $28.3^b \pm 2.1$ ,  $21.6^c \pm 1.8$  and  $26.4^{bc} \pm 1.6$ ; DAB III:  $9.7^a \pm 0.9$ ,  $2.2^b \pm 0.7$ ,  $1.6^b \pm 0.6$  and  $1.1^b \pm 0.5$ ; DAB IV:  $13.6^a \pm 1.8$ ,  $6.6^b \pm 1.4$ ,  $6.5^b \pm 1.2$  and  $2.3^c \pm 1.1$  when assessed at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, respectively. The results of this study show that early or conventional weaning, using two classes of mothers, has no effect on the functionality of the mitochondrial membrane in the offspring of Nelore males. However, when evaluating the sperm of Nelore breed animals in the prepubertal and pubertal stages, it was possible to observe that as the animals get older, the functionality of the mitochondrial membrane becomes better. It can be concluded that there was no effect of fetal programming when using early and conventional weaning on the subsequent offspring of Nelore males sired by primiparous or multiparous mothers, but the functionality of the mitochondrial membrane becomes better as the Nelore males get older.

**Keywords:** Cattle, DAB, Nelore.

**Acknowledgments:** Grant (2017/18937-0) São Paulo Research Foundation (FAPESP).