

## **A prole de machos da raça Nelore sofre influência da programação fetal sobre a funcionalidade de membrana plasmática, ao realizar desmame antecipado e convencional em fêmeas primíparas e multíparas?**

**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>, Arlindo Saran Netto<sup>6</sup>, Germán Darío Ramirez Zamudio<sup>6</sup>, Giovanna Galhardo Ramos<sup>1</sup>, Karine Galhego Morelli<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, São Paulo, 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

O conceito de programação fetal, refere-se a qualquer estímulo ou lesão durante períodos críticos da gestação que modulam o desenvolvimento fetal e promovem efeitos a longo prazo sobre o desempenho da progênie. Ou seja, algo que ocorre com o feto pode ter consequências na saúde e no bem-estar desse indivíduo quando adulto. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do desmame antecipado e convencional sobre a funcionalidade da membrana plasmática da prole subsequente de machos, gerada por fêmeas primíparas ou multíparas. 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 multíparas, desmamaram bezerros 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 multíparas, 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 plasmática foi avaliada pelo teste de resistência osmótica. Para isso, foi previamente preparado uma solução hiposmótica a base de citrato de sódio (7,35 g) e frutose (13,51 g) diluídos em 1000 mL de água destilada e deionizada (150 mOsm/kg). Após a colheita de sêmen, amostras de 40 µL de sêmen foram adicionadas a 960 µL da solução hiposmótica e incubadas durante 60 minutos. Posteriormente foram acrescentados 500 µL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco - DPBS a 4% de formaldeído pré-aquecido a 37°C. Para a leitura 10 µL da solução final foram colocadas entre lâmina de 25 x 76 mm e lamínula de 22 x 22 mm, previamente limpas. Foram avaliadas 200 células em microscopia de contraste de fase sob aumento de 400x, sendo classificadas células com enrolamento da cauda e células com cauda reta. Para obtenção dos resultados foram retirados os valores das anormalidades morfológicas de cauda. O resultado final foi expresso em porcentagem de células com enrolamento da cauda, ou seja, com membrana plasmática funcional. 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 principal de desmame, mãe, idade ou interação ( $p > 0,05$ ) para funcionalidade de membrana plasmática. Tal resultado demonstra que realizar desmame de forma antecipada ou convencional em ambas as classes de mães, não promove efeito de programação fetal na prole subsequente de machos da raça Nelore. Entretanto, de forma geral, machos da raça Nelore, ao começarem a apresentar espermatozoides em seus ejaculados, mesmo que não de forma qualitativa e quantitativa para serem classificados como púberes, possuem a membrana plasmática funcional, diferente de outras características já muito estudadas, como motilidade ou morfologia espermática, as quais vão adquirindo melhor qualidade conforme os animais vão se desenvolvendo e amadurecendo reprodutivamente. 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 multíparas na funcionalidade da membrana plasmática.

**Palavras-Chave:** Bovinos, Hiposmótico, 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>, Arlindo Saran Netto<sup>6</sup>, Germán Darío Ramirez Zamudio<sup>6</sup>, Giovanna Galhardo Ramos<sup>1</sup>, Karine Galhego Morelli<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

The concept of fetal programming refers to any stimulus or injury during critical periods of pregnancy that modulates fetal development and has long-term effects on the performance of the offspring. In other words, something that happens to the fetus can have consequences for the health and well-being of that individual as an adult. The aim of this study was to evaluate the effect of early and conventional weaning on the functionality of the plasma membrane of 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 plasma membrane was assessed using the osmotic resistance test. To do this, a hyposmotic solution was previously prepared based on sodium citrate (7.35 g) and fructose (13.51 g) diluted in 1000 mL of distilled and deionized water (150 mOsm/kg). After semen collection, samples of 40 µL of semen were added to 960 µL of the hyposmotic solution and incubated for 60 minutes. Subsequently, 500 µL of 4% formaldehyde Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) pre-warmed to 37°C were added. For the reading, 10 µL of the final solution were placed between a 25 x 76 mm slide and a 22 x 22 mm coverslip. 200 cells were evaluated under phase contrast microscopy at 400x magnification, and cells with curled tails and cells with straight tails were classified. To obtain the results, the values of the morphological abnormalities of the tail were removed. The final result was expressed as a percentage of cells with tail curling, i.e. with a functional plasma membrane. 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 main effect of weaning, mother, age or interaction ( $p > 0.05$ ) for plasma membrane functionality. This result shows that early or conventional weaning in both classes of mothers does not have a fetal programming effect on the subsequent offspring of Nelore males. However, in general, Nelore males, when they begin to present sperm in their ejaculates, even if not qualitatively and quantitatively enough to be classified as pubescent, have a functional plasma membrane, unlike other characteristics that have already been studied extensively, such as sperm motility or morphology, which acquire better quality as the animals develop and mature reproductively. 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 in terms of plasma membrane functionality.

**Keywords:** Cattle, Hyposmotic, Nelore.

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