



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - CEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

JOÃO VÍTOR LIMA BARBOSA

**SEGURANÇA DO TRATAMENTO COM DIFLUBENZURON EM TOUROS E
DOADORAS BOVINAS**

**BRASÍLIA
2022**



JOÃO VÍTOR LIMA BARBOSA

**SEGURANÇA DO TRATAMENTO COM DIFLUBENZURON EM TOUROS E
DOADORAS BOVINAS**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e Pesquisa.

Orientação: Andrei Antonioni Guedes Fidelis

**BRASÍLIA
2022**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a toda a minha família. Pai, Mãe, Gui, Biel, Lara e meus avós. Agradeço também aqueles que são minha família dentro da profissão. Otávio, Letícia, Dr. João e principalmente ao Andrei, meu pai na Medicina Veterinária. Esse que constantemente me mostra o caminho das pedras, a realidade e que independente do quanto a vida te vai derrubar, o importante é seguir em frente, aprender com os erros, ser humilde e correto em todas as instâncias da vida. Ao corpo docente do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Brasília e a Assessoria de pesquisa e seus membros. Agradeço também aos membros da Embrapa e da Bio Reprodução Animal que possibilitaram a realização deste projeto. Agradeço a minha namorada, companheira e amiga Hallya Beatriz que está sempre presente me dando suporte em tudo que eu necessito.

RESUMO

O estudo foi realizado com o intuito de avaliar potenciais efeitos na produção e qualidade de gametas, levando em conta possíveis consequências na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Foram realizados dois experimentos, sendo o primeiro para avaliar qualidade do sêmen e o segundo para avaliar a qualidade do complexo cumulus-ovócito (COC) e PIVE. Touros (n=14) e matrizes (n=16) da raça Nelore foram divididos em grupo controle (GC) ou grupo tratamento (DIF). O grupo tratado recebeu o diflubenzuron misturado a suplementação mineral (30 mg/animal/dia) em um período de exposição de nove semanas. Foi realizado a pesagem e colheita de sangue durante o período experimental. Coletas de sêmen e aspirações foliculares guiadas por ultrassom foram realizadas com um intervalo de duas semanas. Após avaliação física e morfológica, o sêmen foi armazenado para uma futura análise computadorizada de outros parâmetros. Os COC aspirados foram avaliados de acordo com sua morfologia e aqueles classificados como viáveis foram enviados para o laboratório de PIVE. O diflubenzuron não demonstrou efeitos ($p>0,05$) na média de peso corporal ou outros parâmetros hematológicos e bioquímicos, independentemente também de gênero. No experimento 1, não houve diferença ($p>0,05$) entre o GC e DIF nos parâmetros espermáticos de concentração, morfologia e motilidade. No experimento 2 também não houve variações significativas nos números totais, viáveis ou de classificação I de ovócitos, assim como nas taxas de clivagem ($p>0,05$). Portanto administrações orais de diflubenzuron em doses recomendadas, não demonstraram efeitos deletérios a curto prazo na produção e qualidade espermática ou no desenvolvimento de ovócitos e seu potencial na PIVE.

Palavras-chave: Difly, toxicologia reprodutiva, produção *in vitro* de embriões.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
_3.1 Animais e localização	5
_3.2 Delineamento experimental	5
_3.3 Colheita de sangue e análise.....	6
_3.4 Coleta de sêmen e análise	6
_3.5 Aspiração dos ovócitos e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	7
_3.6 Análise de dados	8
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
_4.1 Experimento 1	10
_4.2 Experimento 2	12
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
6.REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

O diflubenzuron (DFBZ) (1-(4-clorofenil)-3-(2,6-diflurobenzoil)uréia) é uma molécula da classe das benzoilfeniluréias, classe amplamente utilizada desde os anos 70 no controle de artrópodes tanto em áreas urbanas como em áreas rurais (SUN et al., 2015). Sua ação se baseia na inibição da síntese de quitina, material que compõe o exoesqueleto, regulando assim o crescimento de larvas e outros estágios juvenis de insetos. A aplicação do DFBZ na pecuária se dá principalmente no controle de mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), mosca comum (*Musca domestica*), mosca dos estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e o carrapato-de-boi (*Rhipicephalus microplus*)(GRISI et al., 2014; RODRIGUES; LEITE, 2013). O DFBZ é pouco absorvido no trato gastrointestinal de bovinos, sendo excretado quase em sua totalidade nas fezes e urina, não havendo a necessidade de período de carência para abate e podendo ser usado em animais lactantes (IVIE, 1978; TFOUNI et al., 2013; VAN DER LEEK et al., 1991). Utilizando doses recomendadas, os resíduos na carne e no leite são indetectáveis ou ficam dentro de quantidades residuais aceitáveis (FAO, 2011), representando assim baixos riscos para a saúde pública (JUNQUERA et al., 2019; SUN et al., 2015).

Por mais que o uso do DFBZ seja seguro para o gado, sua toxicologia em espécies não-alvo é controversa. Não foram observados efeitos carcinogênicos *in vitro* (BAYOUMI et al., 2003; PEROCCO; COLACCI; GRILLI, 1993), porém efeitos dose-dependentes de genotoxicidade e mutagenicidade foram observados em certos modelos animais (DE BARROS et al., 2013). Outros possíveis modelos não demonstraram tais efeitos prejudiciais (QUARLES; NORMAN; KUBENA, 1980). Essa divergência pode estar associada ao efeito indireto de metabólitos, como a 4-cloroanilina, oriunda da pequena porção que é absorvida e metabolizada pelo indivíduo (DE BARROS et al., 2016). O DFBZ também demonstrou induzir apoptose e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (LEE et al., 2021). Efeitos deletérios nas células e na integridade do DNA são particularmente problemáticos em gametas e embriões, sendo esses importantes fatores a se levar em conta na toxicologia reprodutiva. Além do efeito supressor na síntese de quitina, o DFBZ também prejudica a oogenese e reduz a população folicular em insetos adultos (SMAGGHE; ZOTTI; RETNAKARAN, 2019). Tais efeitos podem potencialmente agir na gametogênese de outras espécies, sendo esse um ponto de risco a se

avaliar. No entanto, poucos estudos avaliaram os potenciais efeitos reprodutivos do DFBZ em bovinos.

A PIVE é uma das principais técnicas utilizadas para produção de embriões em diversos países, atingindo números de produção três vezes maiores quando comparados a produção *in vivo* (VIANA, 2020). Além de uma importante ferramenta em programas reprodutivos, a PIVE também é usada como uma importante forma de verificar efeitos ambientais e alterações endócrino-reprodutivas. A maturação *in vitro* (MIV) de ovócitos bovinos vem sendo proposta como um possível método de avaliar agressões químicas e seus consequentes distúrbios, necessitando de uma menor quantidade de animais para demonstrar possíveis efeitos deletérios quando comparado a modelos de estudo *in vivo* (LUCIANO et al., 2010). O uso de espécies bovinas como modelo experimental também pode ser utilizado para averiguar possíveis efeitos tóxicos na reprodução humana, devido à proximidade na fisiologia ovariana das duas espécies (SANTOS; SCHOEVERS; ROELEN, 2014). De forma similar, avanços na avaliação de sêmen como o uso de *computer-assisted sperm analysis* (CASA), possibilitaram uma maior acurácia na identificação de possíveis interferências na fisiologia reprodutiva masculina.

O objetivo do estudo foi avaliar efeitos deletérios a curto prazo ocasionados pelo uso de DFBZ na quantidade, qualidade e potencial de desenvolvimento de gametas bovinos. Assim, o uso de diferentes técnicas analíticas como o CASA e modelos *in vitro-in vivo* associados a aspiração e PIVE são importantes para validar avaliações tóxicas anteriores e a segurança de uso do DFBZ em bovinos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Inibidores da síntese de quitina são fármacos que atuam diretamente na produção desse polissacarídeo. Assim, artrópodes que necessitam da quitina para formação do exoesqueleto, principalmente quando em estágios mais juvenis, morrem por desidratação devido à má formação de estruturas externas. Tal farmacodinâmica é de grande seletividade, uma vez que mamíferos não necessitam da produção de quitina, sendo virtualmente atóxico para mamíferos não-alvo (JUNQUERA et al., 2019; OLIVEIRA; STASI, 2012; SUN et al., 2015).

O DFBZ é uma das principais moléculas das benzoifeniluréias, inibidores da síntese de quitina amplamente utilizados na agricultura e na pecuária para controle de pragas (JUNQUERA et al., 2019). A segurança de fármacos como o DFBZ deve continuar sendo testada, sem deixar de lado possíveis consequências reprodutivas, visto que novos métodos analíticos e modelos experimentais vem sendo desenvolvidos.

Porém, em diferentes modelos experimentais, foram demonstrados efeitos adversos. Entre eles, a formação de meta-hemoglobina e aumento na produção de reticulócitos foram demonstradas em ratos (TASHEVA; HRISTEVA, 1993). Presença de uréia e enzimas hepáticas aumentadas também foram evidenciadas quando utilizado em doses maiores do que o recomendado em ratos, assim sendo necessário verificar possíveis sinais de toxicidade sistêmica (DE BARROS et al., 2016).

Já no aspecto reprodutivo, é necessário levar em conta o DFBZ como um possível agressor, uma vez que tal fato já foi demonstrado, havendo a diminuição do peso testicular e diminuição na produção diária de espermatozoides (DE BARROS et al., 2016). Outras moléculas da classe das benzoifenilureias também possuem efeitos prejudiciais no aparato reprodutivo. O lufenuron demonstrou também em ratos aumentos em taxas de reabsorção e perda fetal pós-implantação, o que indica que tal fármaco influencia em aspectos reprodutivos (BASAL et al., 2020). Por tanto, a avaliação com diferentes métodos deve ser realizada a fim de descobrir a forma de agressão e conseqüentemente destinar corretamente o uso de tais fármacos. Novos métodos como o uso de CASA e a PIVE, podem ser bons indicativos de possíveis alterações reprodutivas causadas pelo fármaco (KOLLÁR; HORVÁTH; CSENKI-BAKOS, 2021).

Achados *in vitro* também demonstraram que células da glândula mamária podem realizar apoptose devido a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Tais espécies reativas geram um aumento no estresse oxidativo, uma vez que interagem com DNA e lipídeos. Tal genotoxicidade indireta deve ser avaliada, assim sendo a PIVE uma boa opção para evidenciar possíveis efeitos com o uso de uma menor quantidade de animais para tal fim (LUCIANO et al., 2010). Outras classes praguicidas também ocasionam aumento nas espécies reativas de oxigênio, sendo esse um fator deletério para o desenvolvimento de embriões *in vitro* (ŠEFČÍKOVÁ et al., 2018; VASCONCELOS et al., 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e localização

O experimento 1 foi realizado em uma fazenda privada localizada em Formosa, GO, Brasil. Touros púberes de raça nelore (*Bos taurus indicus*) (n=14), sem anormalidades detectáveis durante o exame andrológico foram selecionados. Os touros foram mantidos em pasto de *Brachiaria sp.* com acesso irrestrito a água, recebendo também 2Kg/animal/dia de suplementação mineral. O experimento 2 foi conduzido na estação experimental Sucupira (Embrapa), localizada em Brasília, DF, Brasil. Novilhas, nulíparas, púberes e cíclicas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) (n=16) sem patologias reprodutivas detectadas durante o exame ginecológico foram selecionadas. Tais novilhas foram confinadas e receberam uma dieta de manutenção constituída por silagem de milho e suplementação mineral (100 mg/Animal/dia), havendo um período de adaptação de duas semanas anterior ao experimento. Todos os procedimentos utilizando animais para pesquisa foram realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética, Bioética e Bem-estar Animal (CEBEA), sendo aprovadas pela comissão de Ética no Uso de animais da Embrapa (Protocolo CEUA-002/2022). O proprietário da fazenda privada assinou um termo de consentimento para uso dos animais no estudo.

3.2 Delineamento experimental

O estudo foi subdividido em dois experimentos (para touros e novilhas, respectivamente), ambos seguindo um delineamento experimental semelhante. Em ambos os experimentos, os animais foram divididos em grupo controle (GC) e grupo tratamento (DIF). Os touros foram alocados nos grupos de forma aleatória, porém as novilhas foram ranqueadas de acordo com sua população de folículos antrais (PFA), e em ordem decrescente foram alocadas de forma alternada no GC ou DIF. O balanceamento da distribuição foi confirmado devido a ausência de diferença ($p > 0,05$) na contagem da PFA ao início do experimento. O grupo experimental recebeu a suplementação mineral com a adição do DFBZ (DIF) ou não (GC), sendo calculada para cumprir com as necessidades minerais diárias, sendo fornecido no grupo DIF de forma a garantir o consumo de 1g da formulação comercial (Difly, Champion, Anápolis, Brasil) de DFBZ a 3% (30 mg/animal/dia), durante nove semanas. O peso corporal foi mensurado e amostras de sangue foram colhidas semanalmente nas novilhas e a cada 15 dias

nos touros. As coletas de sêmen e aspirações foliculares guiadas por ultrassom (OPU) foram realizadas logo após o tratamento com um intervalo de duas semanas, totalizando assim 5 sessões em cada experimento. Foi realizada a análise física e morfológica do sêmen, havendo preservação de amostras para futuras análises computadorizadas, utilizando o *computer-assisted sperm analysis* (CASA). Os complexos *cumulus*-ovócitos aspirados foram avaliados de acordo com sua morfologia e enviados a um laboratório de PIVE.

3.3 Colheita de sangue e análise

Amostras sanguíneas foram coletadas por punção da veia ou artéria coccígea, utilizando agulhas de dois lados 21G. Duas amostras de cada animal foram coletadas em tubos de vácuo de 5 mL, uma com e outra sem K3 EDTA (Vacutainer Systems; Becton Dickinson, São Paulo, SP, Brasil). As amostras foram refrigeradas (5°C) e transportadas para um laboratório comercial de análise. Cada amostra teve hemograma e marcadores bioquímicos avaliados.

3.4 Coleta de sêmen e análise

As amostras de sêmen foram coletadas por eletroejaculação descritos por (DOROTEU et al., 2021). Os touros foram colocados em um tronco de contenção individual e a ejaculação foi induzida pelo eletroejaculador na predefinição #4 (Autojac 3, Neovet, Uberaba, Brasil). Amostras (20 µL) de sêmen fresco foram avaliadas sob um aumento de 200x para verificar turbilhonamento, vigor e motilidade, e sob um aumento de 1000x para avaliação morfológica das células espermáticas.

O sêmen foi diluído em uma proporção de 1:1 com o diluidor (Optixcell, IMV Technologies Brasil, Campinas, Brasil) e mantido em refrigeração (5°C) até o laboratório. O sêmen fresco de cada touro foi re-diluído em proporção 1:10 em Optixcell e uma amostra de 3 µL foi analisada em câmara de contagem (Leja, IMV Technologies) utilizando CASA (Sperm Vision Minitube GMBH, Tiefenbach, Germany), com a predefinição padrão do equipamento. O sêmen restante foi diluído, de acordo com a concentração determinada pelo CASA, para uma concentração final de 50×10^6 espermatozoides/ml, colocados em palhetas de 0,5 mL, estabilizados a 4°C por 4 horas e congelados, utilizando uma máquina de congelamento (Cryogen, Neovet) com a curva de resfriamento padrão para gado. Amostras do sêmen

congelado também foram avaliadas por CASA, imediatamente após o descongelamento ou após submissão ao teste de termo-resistência (TRT) durante 4 horas.

3.5 Aspiração dos ovócitos e produção *in vitro* de embriões

Todos os exames ultrassonográficos e a OPU foram realizadas utilizando um equipamento de ultrassonografia portátil (MyLab 30 Gold Vet, Esaote, Genova, Italia) equipadas com transdutor linear retal de 7.5 MHz ou microconvexo vaginal de 7.5 MHz montado em guia e agulha de aspiração de polietileno (WTA Tecnologia Aplicada, Cravinhos, Brasil). Antes da primeira OPU, a PFA foi gravada e contada para balancear a distribuição das novilhas entre os tratamentos.

Os procedimentos da OPU-PIVE foram descritos por (MALARD et al., 2020). Os COC imaturos foram coletados por punção e aspiração folicular de folículos visíveis (>2mm), usando agulhas 20 G e pressão de aproximadamente 80 mm/Hg. O fluido folicular foi aspirado para tubos de 50 mL contendo DPBS adicionado de 1% de soro fetal bovino (SFB) e 125 UI/mL de heparina sódica. A qualidade dos COCs foi avaliada sob estereomicroscópio a um aumento de 40x, sendo aqueles classificados como viáveis de acordo com sua morfologia, transferidos para tubos de 1,2 mL cryotubes (Corning, Nova Iorque, EUA) contendo meio de maturação. Os ovócitos foram transportados em uma incubadora portátil (Minitub do Brasil, Porto Alegre, Brasil) a 38°C ao laboratório de PIVE.

O COC de cada doadora passou pelos estágios de MIV, fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) separadamente. A MIV teve duração de 20 h em TCM199 (Gibco, Nova Iorque, EUA) suplementado com 0,05 UI/mL de FSH (Pluset, Hertape-Calier, Barcelona, Espanha), 1mg/mL de estradiol e 10% de SFB em estufa com atmosfera de 5% CO₂ a 38,5°C. COC expandidos foram parcialmente desnudos e transferidos para gotas com meio TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina, 20 µM D-penicilamina, 10µM hipotaurina e 1 µM epinefrina. FIV foi realizada com 1 x 10⁶ espermatozoides/mL durante 18h. O sêmen de apenas um touro de fertilidade comprovada foi utilizado para a fecundação. Os possíveis zigotos foram cultivados em gotas de fluido de oviduto sintético (SOFaa) suplementado com aminoácidos, 0,34 mM de tricitrato de sódio, 2,77 mM de myo-insotol e 10% de SFB submersos em óleo mineral. As taxas de clivagem e blastocistos foram determinadas em 72h e 168h após a inseminação. Os blastocistos foram classificados de acordo com seus estágios

de desenvolvimento (blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido ou blastocisto eclodido). Um subconjunto de blastocisto expandidos (aproximadamente 30/manipulação/grupo) foram colocados em lâminas, corados com corante Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e avaliados no microscópio (aumento de x1000) para o número de células (Massa celular interna e trofoblasto).

3.6 Análise de dados

Parâmetros relacionados ao peso, hematológicos e bioquímicos, produção e qualidade espermática, colheita de ovócitos e PIVE foram comparados entre o GC e DIF utilizando o GLIMMIX procedure (SAS Studio 3.8 University Edition; SAS Institute Inc. Cary, NC, EUA) para mensurações repetidas durante o tempo. O teste incluiu os efeitos do tratamento (controle ou DFBZ), tempo (coleta de sêmen ou sessão de OPU-PIVE), e suas interações, sendo também ajustado para o tipo de distribuição de cada variável. Devido a uma baixa frequência individual, patologias espermáticas foram agregadas em defeitos maiores e menores como descreve Johnson (1997). Blastocistos expandidos também foram divididos em grupos de acordo com a quantidade de células, sendo esses >100 ou <100. A diferença entre médias foi determinada utilizando teste T. Resultados são demonstrados por média±erro padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal e parâmetros hematológicos não demonstraram diferença entre o GC e DIF (tabela 1). Não foram demonstrados efeitos no uso de DFBZ ($p > 0,05$), independente do sexo quando comparados os grupos DIF e GC. Efeitos tempo-dependentes ($p < 0,05$) foram observados no peso de machos e nos parâmetros hematológicos, com exceção do hematócrito ($p > 0,05$). Já em fêmeas não houve efeito tempo-dependente para peso ($p > 0,05$), porém houve para todos os outros parâmetros hematológicos ($p < 0,05$). Entretanto, a interação entre tratamento x tempo foi observada apenas para creatinina e fosfatase alcalina em machos ($p < 0,05$).

Tabela 1: Peso corporal e parâmetros hematológicos (média \pm erro padrão) de touros e novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratados (DIF) ou não (GC) com 30 mg/DFBZ/dia, durante 9 semanas.

Parâmetro	Gênero	GC	DIF	P-value			Valor de Ref. ²
				Tratamento	Tempo	Trat*tempo	
Peso (Kg)	M	728.9 \pm 20.3	715.5 \pm 24.1	0.9831	0.0123	0.2163	--
	F	524.1 \pm 5.3	559.5 \pm 7.9	0.1057	0.7229	0.9995	
Hematócrito (%)	M	39.0 \pm 0.8	41.1 \pm 0.7	0.2156	0.4779	0.9466	24.0 a 46.0
	F	42.8 \pm 0.5	40.9 \pm 0.5	0.1842	0.0023	0.1386	
Proteína (g/dL)	M	7.7 \pm 0.1	7.9 \pm 0.1	0.1487	0.0462	0.6179	7.0 a 8.5
	F	7.2 \pm 0.1	7.2 \pm 0.1	0.5855	<0.0001	0.0982	
Creatinina (mg/dL)	M	2.5 \pm 0.0	2.3 \pm 0.1	0.3294	0.0050	0.0419	1.0 a 2.0
	F	2.5 \pm 0.2	2.6 \pm 0.1	0.2274	0.0074	0.6820	
FA ³ (U/L)	M	191.9 \pm 10.0	185.7 \pm 10.6	0.7244	0.0034	0.0003	90 a 170
	F	124.6 \pm 3.7	120.4 \pm 3.1	0.7806	0.0395	0.5575	

Legenda: ¹ M: macho; F: fêmea; ² Valores de referência para os parâmetros fisiológicos de bovinos adotado pelo laboratório responsável pela análise. ³ Fosfatase Alcalina.

Foi demonstrado em outros modelos experimentais que o tratamento com Diflubenzuron gera aumento na fosfatase alcalina (FA) (DE BARROS et al., 2016). No presente estudo, não foram observadas alterações nos parâmetros fisiológicos. Flutuações durante o tempo em biomarcadores já eram esperados, porém a creatinina foi o único parâmetro que se apresentou fora da faixa esperada para a espécie (ROLAND; DRILLICH; IWERSEN, 2014; ROWLANDS, 1980). Em ambos os grupos, a creatinina se apresentou acima dos valores considerados como normais pelo laboratório responsável. Entretanto os animais permaneceram sendo monitorados e sadios, sem apresentar outros sinais de intoxicação. Especula-se que esse aumento tenha sido devido a fatores ambientais que podem afetar os limiares e a largura de intervalos, conforme outros relatos (ROLAND; DRILLICH; IWERSEN, 2014).

4.1 Experimento 1

Dois touros não se adaptaram a rotina coleta de sêmen e foram removidos do experimento, assim GC e DIF foram constituídos por 5 e 7 touros respectivamente. O tratamento com DFBZ não demonstrou efeitos nos parâmetros espermáticos em nenhum aspecto físico ou no CASA ($p > 0,05$), independentemente de ter sido feita em sêmen fresco, descongelado ou descongelado e sob TRT (Tabela 2). Porém, houve um efeito tempo-dependente ($p < 0,05$) na maioria dos parâmetros analisados. Efeitos do tratamento x tempo foram pouco observados, sendo nesses casos associados a flutuações dos valores, e não a tendências crescentes ou decrescentes durante o experimento.

Tabela 2: Parâmetros espermáticos (média \pm erro padrão) em touros Nelore (*Bos taurus indicus*) tratados (DIF) ou não (GC) com 30 mg diflubenzuron/dia por 9 semanas.

Parâmetros	GC	DIF	P-value		
			Tratamento	Tempo	Trat*tempo
Exame físico					
Volume (mL)	6.6 \pm 0.4	4.4 \pm 0.5	0.0634	0.2365	0.0250
Motilidade (%)	65.6 \pm 2.6	65.5 \pm 4.0	0.4239	0.6457	0.1908
Vigor ¹	3.6 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	0.4205	0.0053	0.0131
Turbilhonamento ¹	2.5 \pm 0.3	2.7 \pm 0.3	0.6363	0.0001	0.4567
Defeitos maiores (%) ²	21.5 \pm 2.0	14.1 \pm 1.3	0.0569	0.4750	0.2126
Defeitos menores (%) ³	8.3 \pm 1.9	12.6 \pm 2.5	0.2866	0.0356	0.3536
Parâmetros do CASA ⁴					

Sêmen fresco					
MOT (%)	81.8±2.3	76.4±3.5	0.6410	0.7706	0.7290
DCL (µm)	80.3±2.1	81.5±3.1	0.6125	0.0032	0.0505
DAP (µm)	39.1±0.9	40.1±1.4	0.3150	0.022	0.0526
DSL (µm)	23.1±0.4	24.5±0.9	0.0690	0.0087	0.0407
VCL (µm/s)	185.3±5.0	187.2±7.0	0.6252	0.0047	0.1637
VAP (µm/s)	90.6±2.1	92.5±3.3	0.3205	0.0258	0.1908
VSL (µm/s)	53.8±1.1	57.1±2.0	0.0632	0.0078	0.1105
LIN (%)	0.3±0.0	0.3±0.0	0.1773	0.0001	0.7351
STR (%)	0.6±0.0	0.6±0.0	0.2532	0.0001	0.8774
WOB (%)	0.5±0.0	0.5±0.0	0.3189	0.0001	0.1447
BCF (Hz)	24.6±0.4	24.6±0.8	0.2960	0.2244	0.1429
ALH (µm)	7.3±0.2	7.1±0.3	0.8133	0.1458	0.6122
Sêmen descongelado					
MOT (%)	28.3±2.9	27.8±2.7	0.8516	0.0001	0.0132
DCL (µm)	60.7±2.4	63.1±3.2	0.6801	0.0033	0.1851
DAP (µm)	30.8±0.9	32.8±1.3	0.4527	0.0081	0.1210
DSL (µm)	22.5±0.6	24.3±0.9	0.3547	0.0032	0.0281
VCL (µm/s)	136.6±5.0	143.1±6.8	0.5954	0.0032	0.1158
VAP (µm/s)	69.8±1.8	74.9±2.7	0.3450	0.0096	0.0618
VSL (µm/s)	50.9±1.3	55.7±1.7	0.2152	0.0057	0.0104
LIN (%)	0.4±0.0	0.4±0.0	0.2948	0.0024	0.8670
STR (%)	0.7±0.0	0.7±0.0	0.5747	0.4309	0.5898
WOB (%)	0.5±0.0	0.5±0.0	0.2144	0.0001	0.8608
BCF (Hz)	25.3±0.8	25.1±0.7	0.8463	0.0628	0.3057
ALH (µm)	5.4±0.1	5.5±0.1	0.7235	0.3370	0.0077
Sêmen descongelado após TRT ⁵					
MOT (%)	21.5±2.5	18.8±2.0	0.2467	0.0001	0.0097
DCL (µm)	48.6±2.6	41.1±1.9	0.1054	0.0029	0.5368
DAP (µm)	26.5±1.1	23.3±0.8	0.0787	0.0009	0.4765
DSL (µm)	20.7±0.8	18.4±0.6	0.0639	0.0013	0.4316
VCL (µm/s)	108.5±5.6	92.3±3.8	0.0935	0.0031	0.3612
VAP (µm/s)	59.6±2.5	53.1±1.5	0.0711	0.0003	0.2227
VSL (µm/s)	46.6±1.8	42.2±1.1	0.0584	0.0003	0.2101
LIN (%)	0.4±0.0	0.5±0.0	0.2065	0.0153	0.9822
STR (%)	0.8±0.0	0.8±0.0	0.4490	0.0388	0.6685
WOB (%)	0.6±0.0	0.6±0.0	0.1695	0.0141	0.9821
BCF (Hz)	25.0±0.8	22.2±0.8	0.0682	0.0516	0.5585

ALH (μm)	4.2 \pm 0.2	4.2 \pm 0.1	0.7757	0.1680	0.0117
-----------------------	---------------	---------------	--------	--------	--------

Legenda: ¹ Escore subjetivo (1 a 5); ² Defeitos maiores: acrosoma defeituoso; cabeça amorfa; pouch formation; cabeça estreita na base; cabeça anormal destacada; microcefálico; cabeça piriforme; Cauda dobrada com gota citoplasmática distal; cauda enrolada; cauda dobrada; acrossoma em saca rolhas; formas tetralógicas; gota citoplasmática proximal; defeitos de peça intermediária. ³ Defeitos menores: pseudo-gotas; acrossoma destacado; cabeça estreita; macrocefalia; decapitado; cauda torcida; cauda dobrada; gota citoplasmática distal; implantação de cauda abaxial. ⁴ MOT: Motilidade; DCL: Distância curvilínea; DAP: Distância de caminho médio; DSL: Distância retilínea; VCL: velocidade curvilínea; VAP: velocidade média do caminho; VSL: velocidade contínua em linha; LIN: linearidade; STR: movimento retilíneo; WOB: coeficiente de Wobble; BCF: frequência de batidas cruzadas; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça; ⁵ teste de termo-resistência.

A toxicologia reprodutiva do DFBZ foi avaliada principalmente em roedores, demonstrando que uma exposição subaguda estava associada a diminuição no peso testicular e na produção diária de espermatozoides, sem afetar a morfologia espermática (DE BARROS et al., 2016). Porém é necessário haver cautela ao comparar as duas espécies (bovinos x ratos) visto que existem diferenças fisiológicas e na dose utilizada. Foram poucos relatos que avaliaram a toxicologia e efeitos reprodutivos do DFBZ em gado. Estudos conduzidos ao final da década de 70 com jovens machos de raça Holandesa não encontraram efeitos deletérios. Esse estudo realizou apenas uma análise de sêmen. Este experimento abrangeu uma janela de 63 dias, assim possibilitando a ocorrência de ciclos de espermatogênese por parte do epitélio seminífero dos touros (STAUB; JOHNSON, 2018). Tais fatores somados ao uso do CASA, possibilitaram uma análise aprofundada de possíveis efeitos nas células espermáticas. Nenhuma evidência de efeitos indesejados foi demonstrada.

4.2 Experimento 2

As 5 sessões de OPU renderam 801 (631 viáveis) e 986 (797 viáveis) ovócitos do GC e do DIF respectivamente. A terceira sessão de PIVE sofreu contaminação microbiológica, sendo os dados dessa manipulação descartados. Semelhante ao que foi observado no sêmen, um efeito tempo-dependente foi observado para a maioria dos parâmetros analisados, porém, não foi observada diferença entre os grupos em nenhum parâmetro ($p > 0,05$). Foi detectado uma interação tempo x tratamento no número de folículos aspirados ($p < 0,05$) que diminuiu constantemente no GC e aumentou ($p < 0,05$) da seção 3 para a 4 no DIF. As proporções de blastocistos e embriões > 100 células, demonstrou flutuação em ambos os grupos. Os dados foram compilados na tabela 3.

Tabela 3: Resultados das seções de OPU-PIVE (média \pm erro padrão) em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas (DIF) ou não (CG) com 30 mg diflubenzuron/dia, durante 9 semanas.

Parâmetros	GC	DIF	P-value		
			Treatment	Time	Trat*tempo
OPUs (n)	40	40			
Foliculos aspirados (n)	27.4 \pm 2.1	26.7 \pm 1.7	0.8826	0.0403	0.0114
Total COC (n)	20.0 \pm 1.8	24.7 \pm 1.9	0.3694	0.0320	0.1423
Taxa de recuperação (%)	78.1 \pm 3.1	88.4 \pm 2.4	0.0957	0.1517	0.1786
COC viáveis (n)	15.8 \pm 1.6	19.9 \pm 1.8	0.3947	0.5842	0.2358
Taxa de viáveis (%)	77.9 \pm 2.0	78.7 \pm 1.9	0.8202	<0.0001	0.8760
COC Grau I (n)	2.4 \pm 0.4	3.4 \pm 0.6	0.3242	0.0005	0.1747
Ovócitos desnudos (n)	0.4 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	0.1213	0.0286	0.8598
COC degenerados (n)	2.0 \pm 0.3	2.3 \pm 0.2	0.4203	0.0010	0.9885
COC Expandidos (n)	2.4 \pm 0.3	2.1 \pm 0.3	0.6497	<0.0001	0.1420
IVEP (n) ¹	32	32			
Clivados (n)	9.2 \pm 1.3	14.5 \pm 2.0	0.1913	0.1373	0.7390
Taxa de clivagem (%)	58.9 \pm 3.8	67.5 \pm 3.3	0.2893	0.0025	0.7041
Blastocistos (n)	6.1 \pm 0.9	9.6 \pm 1.2	0.1873	0.0781	0.8595
Taxa de blastocistos (%)	39.7 \pm 3.5	44.5 \pm 2.4	0.5301	0.0127	0.2719
Blastocistos expandidos (n)	4.0 \pm 0.7	6.2 \pm 0.9	0.2743	0.2368	0.7597
Blastocistos expandidos (%) ²	64.2 \pm 5.7	63.3 \pm 4.1	0.7913	0.1449	0.0127
Embriões > 100 células (n)	3.5 \pm 0.6	3.7 \pm 0.6	0.9452	0.0450	0.0010

Legenda: ¹ Uma sessão de PIVE foi perdida devido a contaminação. Os dados foram excluídos dos cálculos; ² Calculado sobre o total de blastocistos.

Quando experimentos possuem contagem de PFA como parâmetro é o viés de alocação dos indivíduos dentro dos grupos. Indivíduos podem produzir quantidades acima de 100 de folículos (PONTES et al., 2011; RESENDE; BOHRER; VIANA, 2021) diferentemente de outros que podem recrutar poucos durante uma onda folicular. Assim, torna-se necessário o uso de estratégias para balancear e alocar corretamente os indivíduos dentro dos grupos. A

estratégia utilizada no presente estudo assegura que caso houvesse diferença entre DIF e GC, seria devido ao tratamento.

Assim como em touros, não foram demonstradas evidências de interferências no uso do DFBZ em índices reprodutivos. Porém algumas alterações tempo-dependentes eram esperadas, particularmente reduções na obtenção dos ovócitos, devido a repetidas OPUs (GIMENES et al., 2015). Não foram encontrados estudos anteriores que associassem agressões causadas pelo DFBZ gerando efeitos na qualidade de ovócitos. No caso dos insetos, não há apenas uma ação na produção de quitina, mas também efeitos na reprodução de fêmeas adultas, reduzindo população folicular, formação de gema e fecundação (SMAGGHE; ZOTTI; RETNAKARAN, 2019; SOLTANI-MAZOUNI, 1994). Tais mecanismos não são completamente conhecidos. Possivelmente efeitos prejudiciais reprodutivos podem ser de difícil demonstração em grandes animais mono-ovulatórios como bovinos, visto que há a necessidade de utilizar muitos animais para enriquecer as variáveis e controlar efeitos ambientais. Por tanto, o modelo utilizado necessita de avaliar uma grande quantidade de gametas, assim como a avaliação do potencial de desenvolvimento durante os pontos críticos de maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário precoce.

Em ambos os grupos, a recuperação de ovócitos e sua qualidade, assim como clivagem e taxa de embriões foram similares à relatos anteriores (MALARD et al., 2020; PONTES et al., 2009, 2011). Assim, as evidências sugerem que não houve interferência do tratamento com DFBZ na foliculogênese e maturação ovocitária, diferente do que é observado em artrópodes.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em geral, não foram demonstradas evidências de efeitos deletérios significativos do tratamento com Diflubenzuron a curto prazo, em dose recomendada na qualidade de gametas ou no potencial de desenvolvimento de embriões bovinos, assim indicando o fármaco como uma possível escolha para animais em regime reprodutivo.

6. REFERÊNCIAS

BASAL, W. T. et al. Lufenuron induces reproductive toxicity and genotoxic effects in pregnant albino rats and their fetuses. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 19544, 11 dez. 2020.

BAYOUMI, A. E. et al. Cytotoxic effects of two antimolting insecticides in mammalian CHO-K1 cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 1, p. 19–23, maio 2003.

DE BARROS, A. L. et al. Genotoxic and Mutagenic Effects of Diflubenzuron, an Insect Growth Regulator, on Mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 76, n. 17, p. 1003–1006, 2 set. 2013.

DE BARROS, A. L. et al. Subacute toxicity assessment of diflubenzuron, an insect growth regulator, in adult male rats. **Environmental Toxicology**, v. 31, n. 4, p. 407–414, abr. 2016.

DOROTEU, E. M. et al. Effect of a single or two doses of an anti-GnRH vaccine on testicle morpho-functional characteristics in Nelore bulls. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 1, p. 153, 6 mar. 2021.

FAO. **Joint FAO Meeting on Pesticides Residues**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/R_eport11/Diflubenzuron.pdf>. Acesso em: 9 ago. 2022.

GIMENES, L. U. et al. The interval between the emergence of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 385–393, fev. 2015.

GRISI, L. et al. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

IVIE, G. W. Fate of diflubenzuron in cattle and sheep. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 1 jan. 1978.

JOHNSON, W. H. The Significance to Bull Fertility of Morphologically Abnormal Sperm. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 2, p. 255–270, jul. 1997.

JUNQUERA, P. et al. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, p. 26, 1 maio 2019.

KOLLÁR, T.; HORVÁTH, Á.; CSENKI-BAKOS, Z. Computer-Assisted Sperm Analysis to Test Environmental Toxicants. Em: [s.l: s.n.]. p. 29–35.

LEE, W. et al. Diflubenzuron leads to apoptotic cell death through ROS generation and mitochondrial dysfunction in bovine mammary epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 177, p. 104893, ago. 2021.

LUCIANO, A. M. et al. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte maturation (IVM) test within ReProTect. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 81–88, ago. 2010.

MALARD, P. F. et al. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8018, 15 dez. 2020.

OLIVEIRA, D. M. C. DE; STASI, L. C. DI. **Farmacologia Veterinária**. Barueri - SP: Manole, 2012.

PEROCCO, P.; COLACCI, A.; GRILLI, S. In vitro cytotoxic and cell transforming activities exerted by the pesticides cyanazine, dithianon, diflubenzuron, procymidone, and vinclozolin on BALB/c 3T3 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 21, n. 1, p. 81–86, 1993.

PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, mar. 2009.

PONTES, J. H. F. et al. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1640–1646, jun. 2011.

QUARLES, J. M.; NORMAN, J. O.; KUBENA, L. F. Absence of transformation by diflubenzuron in a host-mediated transplacental carcinogen assay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 25, n. 1, p. 252–256, dez. 1980.

RESENDE, A. O.; BOHRER, R. C.; VIANA, J. H. M. A record of 485 viable cumulus–oocyte complexes recovered and 165 viable embryos produced in a single ovum pickup session from a Senepol breed donor. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, n. 2, p. 111, 2021.

RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, out. 2013.

ROLAND, L.; DRILLICH, M.; IWERSEN, M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 5, p. 592–598, 13 set. 2014.

ROWLANDS, G. J. A Review of Variations in the Concentrations of Metabolites in the Blood of Beef and Dairy Cattle Associated with Physiology, Nutrition and Disease, with Particular Reference to the Interpretation of Metabolic Profiles. Em: [s.l: s.n.]. p. 172–235.

SANTOS, R. R.; SCHOEVEERS, E. J.; ROELEN, B. A. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 117, 2014.

ŠEFČÍKOVÁ, Z. et al. Fipronil causes toxicity in mouse preimplantation embryos. **Toxicology**, v. 410, p. 214–221, dez. 2018.

SMAGGHE, G.; ZOTTI, M.; RETNAKARAN, A. Targeting female reproduction in insects with biorational insecticides for pest management: a critical review with suggestions for future research. **Current Opinion in Insect Science**, v. 31, p. 65–69, fev. 2019.

SOLTANI-MAZOUNI, N. Effects of ingested diflubenzuron on ovarian development during the sexual maturation of mealworms. **Tissue and Cell**, v. 26, n. 3, p. 439–445, jun. 1994.

STAUB, C.; JOHNSON, L. Review: Spermatogenesis in the bull. **Animal**, v. 12, p. s27–s35, 2018.

SUN, R. et al. Benzoylurea Chitin Synthesis Inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 31, p. 6847–6865, 12 ago. 2015.

TASHEVA, M.; HRISTEVA, V. Comparative study on the effects of five benzoylphenylurea insecticides on haematological parameters in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 13, n. 1, p. 67–68, jan. 1993.

TFOUNI, S. A. V. et al. Determination of diflubenzuron residues in milk and cattle tissues. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 1, p. 301–307, fev. 2013.

VAN DER LEEK, M. L. et al. Effect of an Insecticide Controlled-Release Bolus on a Milk Antibiotic Residue Test. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 2, p. 433–435, fev. 1991.

VASCONCELOS, T. B. DE et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, p. 213–222, 2014.

VIANA, J. H. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals: World embryo industry grows despite the pandemic. **Embryo Technology Newsletter**, v. 39, p. 24–37, 2020.