



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

TATIANE SZÜCS DOS SANTOS BARROS DIAS

**USO DA HOMEOPATIA EM VACAS DA RAÇA NELORE EM DIFERENTES
ESTADOS NUTRICIONAIS SOBRE A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES**



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

TATIANE SZÜCS DOS SANTOS BARROS DIAS

**USO DA HOMEOPATIA EM VACAS DA RAÇA NELORE EM DIFERENTES
ESTADOS NUTRICIONAIS SOBRE A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora:
Prof^a Dr^a Caliê Castilho Silvestre

636.089
D541u

Dias, Tatiane Szücs Dos Santos Barros.

Uso da homeopatia em vacas da raça nelore em diferentes estados nutricionais sobre a produção in vitro de embriões / Tatiane Szücs dos Santos Barros Dias. – Presidente Prudente, 2022.

37 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2022.

Bibliografia.

Orientador: Caliê Castilho Silvestre.

1. Blastocisto. 2. Embriões. 3. Homeopatia veterinária. 4. Nelore. I. Título.

Catálogo na fonte: Michele Mologni – CRB 8 -6204

TATIANE SZÜCS DOS SANTOS BARROS DIAS

USO DA HOMEOPATIA EM VACAS DA RAÇA NELORE EM DIFERENTES ESTADOS NUTRICIONAIS SOBRE A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Defesa apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Ciência Animal.

Presidente Prudente, 13 de Maio de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Caliê Castilho Silvestre
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profª Drª Marilice Zundt
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profª Drª Patrícia Ana Bricarello
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
Florianópolis - SC

DEDICATÓRIA

In memoriam ao meu avô Jorge Lisboa dos Santos, sua perda nos abalou muito, mas nunca desisti, certa de seu orgulho pelo meu sucesso.

À minha mãe, Eliane Szücs, que sempre me apoiou em qualquer decisão, pelos conselhos preciosos, por todo do incentivo e forças. Obrigada pelo amor incondicional, paciência e dedicação na minha educação, foi você o meu grande estímulo nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas, e trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força delas.

Em primeiro lugar, agradeço à Deus e meus espíritos protetores, pela força e energia nos momentos de pouca fé, por toda a proteção durante essa jornada.

Não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Caliê Castilho, pelo empenho e orientação pautada por um elevado nível científico, pela paciência e conselhos, os quais contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional. Muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem me desmotivar, prometo me empoderar deste título.

À minha mãe, Professora Doutora Eliane Szücs, pelos conselhos preciosos, agradeço a enorme compreensão e paciência, pelo encorajamento em todas as fases desta etapa, que mesmo fazendo milagres com seu escasso tempo, ainda me dava forças pra seguir em frente. Pela leitura crítica e atenta, as revisões incansáveis ao longo da elaboração deste trabalho, contribuindo para o seu aperfeiçoamento. Obrigada por acreditar em mim.

À todos os professores do Mestrado, que em meio ao início de uma pandemia, ainda estavam sempre a disposição e se desdobraram para nos transmitir todo o conhecimento que têm.

À minha amiga de sempre, Lívia Donzelli, agradeço pelo apoio e motivação incondicional que ajudou a tornar este trabalho mais leve. Sou grata pela nossa amizade.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus amigos de longa data. E todos os novos amigos que tive o prazer de conhecer ao longo desse mestrado, Walquíria Choma e Betânia Géa, pelo auxílio durante a pesquisa. Cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

Agradeço aos funcionários da Fazenda experimental da Unoeste, que foram sempre muito solícitos e prestativos, os almoços da Rosa que encerraram as longas manhãs de trabalho, e a bibliotecária Jakeline Queiroz Ortega que, sem me conhecer, me ajudou a ultrapassar um grande obstáculo.

Por último, e não menos importante, quero agradecer à minha família pelo apoio incondicional que me deram, especialmente ao meu tio Ginho, Michelle, Raica, Bruna, Rafael, Gabriel, Tânia e minha avó Luísa, pela compreensão por se privarem várias vezes de minha atenção e companhia.

Meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

“Não desanime em razão da crítica. Se a censura é serviço cabível a qualquer um, a realização elevada é obra de poucos.”

Chico Xavier

RESUMO

Uso da homeopatia em vacas da raça nelore em diferentes estados nutricionais sobre a produção in vitro de embriões

A homeopatia é uma alternativa de baixo custo e toxicidade usado na reprodução humana e animal. Em animais, essa terapia é usada em sistemas de produção da pecuária, principalmente na orgânica, uma vez que tem a vantagem de manter o equilíbrio do animal. Além de ser de fácil administração, não produz resíduos e não contamina, portanto, o meio ambiente. Avaliou-se em vacas da raça Nelore tratadas com homeopatia (Homeo-Vita Fertilidade®), ganhando e perdendo peso, a quantidade e qualidade de oócitos aspirados, cultivados e clivados, produção de blastocistos, progesterona plasmática e prenhez das receptoras inovuladas. Dezenove vacas foram divididas em 2 grupos classificados inicialmente em G-C (controle, n=09) e G-H (suplementadas com homeopatia, n=10) após 33 dias em pastagem de baixa qualidade, as fêmeas tiveram a onda folicular sincronizada e foram aspiradas 2,5 dias após a ovulação. Como estavam perdendo peso (em média 1,8 arrobas) compuseram os grupos: grupo G-CLow (controle perdendo peso) e G-HLow (tratada perdendo peso), foram novamente sincronizadas 90 dias após fornecimento de silagem de milho e aspiradas ganhando peso (em média 3,2 arrobas) compondo os grupos: G-CHigh (controle ganhando peso) e G-HHigh (tratada ganhando peso). Independente do peso, as vacas que receberam tratamento com homeopatia, apresentaram resultados significativos ($p=0,0494$) na % de blastocistos (30,5 vs 23,7%), sem afetar o número de CCO's (Complexo cumulus-oócito) aspirados ou a taxa de clivagem. Porém, vacas ganhando peso, independente da homeopatia, exibiram número maior ($p<0,05$) de CCO's GI, GIII, atrésicos e % de viáveis. Oócitos desnudo foi superior ($p<0,05$) em vacas perdendo peso, independente do tratamento. Não houve efeito do tratamento ou peso sobre a concentração plasmática de progesterona ou prenhez das receptoras inovuladas. Concluímos que o uso da homeopatia em vacas da raça Nelore resulta em maior produção de blastocistos e vacas ganhando peso, tem uma maior eficiência na OPU-PIVE (produção in vitro de embriões associada à aspiração folicular guiada por ultrassom), independente do tratamento.

Palavras-chave: blastocisto; homeopatia; OPU-PIVE; reprodução.

ABSTRACT

Use of homeopathy in Nelore cows in different nutritional states on in vitro embryo production

Homeopathy is a cost and toxicity alternative used in human and animal reproduction. In animals, this therapy is used in livestock production systems, mainly organic, since it has the advantage of maintaining the animal's balance. In addition to being easy to administer, it does not produce and therefore does not contaminate the environment. Production, quality and quantity of aspirated, culture and cleaved oocytes, blastocyst production, plasma progesterone, recipient pregnancy in Nelore cows treated with homeopathy (Homeo-Vita Fertilidade®), and weight loss were compared. Nineteen cows were kept in 2 selected groups, initially, in G-C (control, n=09) and G-H qualities with homeopathy, after 33 days, they had in low pasture the synchronized follicular wave and were aspirated 2,5 days after ovulation. As rental weight (on average 1,8 arrobas) with maintain groups: group G-CLow again (control weight loss) and G-HLow (treated weight loss), were synchronized 90 days after corn silage supply and aspirated weight Low again (on average 3,2 arrobas) composing the groups: G-CHigh (smart weight control) and G-HHigh (treated G of intelligent weight). Independents who received weight treatment with homeopathy, results⁴, results² ($p=0.094$) in the proportion of blastocysts, 7% without the number of aspirates of COC's (cysts-oocyte complex) or the cleavage rate. However, cows that gained weight, regardless of homeopathy, exhibited a higher number ($p<0.05$) of COC's GI, GIII, atresics and % viable. Naked oocytes were superior ($p<0.05$) on weight loss vacations, regardless of treatment. There was no effect of treatment or weight on plasma progesterone concentration or pregnancy in inoculated recipients. We conclude that greater use of homeopathy in Nelore cows results in blastocyst production and weight-optimized cows have a higher efficiency (OPU-PIVE in vitro embryo production associated with ultrasound-guided aspiration), regardless of what they do.

Keywords: blastocyst; homeopathy; OPU-PIVE; reproduction.

SUMÁRIO

1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
ANEXO A– PARECER FINAL CEUA.....	31
ANEXO B– NORMAS DA REVISTA - THE JOURNAL OF VETERINARY MEDI CAL SCIENCE (JVMS).....	32

1 ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO CIENTÍFICO PARA PUBLICAÇÃO SEGUINDO AS NORMAS DA REVISTA
THE JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE

Qualis A2/Fator de impacto: 1.267 (2020)

* As citações no texto estão diferentes das normas da revista para facilitar as correções posteriormente.

Uso da homeopatia em doadoras de oócitos da raça Nelore aumenta a produção *in vitro* de embriões

Tatiane Szücs dos Santos Barros Dias^a, Marilice Zundt^a, Paulo C. Gomes da Silva^a, Lilian Francisco Arantes de Souza^b, Ines Cristina Giometti^a, Betânia Géa Garcia^a, Murilo Magro Ferreira^a, Walquíria Woicikieviz Choma^a, Caliê Castilho^{a*}

^aUniversidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil

^bUniversidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

*Corresponding author: Caliê Castilho, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Rodovia Raposo Tavares, km 572, Limoeiro, Presidente Prudente, SP, 19067175, Brasil, Tel: +55 18 3229-2115 e-mail: calie@unoeste.br

Objetivou-se avaliar, em vacas da raça Nelore tratadas com homeopatia (Homeo-Vita Fertilidade®), ganhando e perdendo peso, a quantidade e qualidade de oócitos aspirados, cultivados e clivados, produção de blastocistos, progesterona plasmática e prenhez das receptoras inovuladas. Dezenove vacas foram divididas em 2 grupos classificados inicialmente em G-C (controle, n=09) e G-H (suplementadas com homeopatia fertilidade, n=10) após 33 dias em pastagem de baixa qualidade, tiveram a onda folicular sincronizada e foram aspiradas 2,5 dias após a ovulação, perdendo peso (em média 1,8 arrobas) e compuseram os grupos: grupo G-CLow (controle perdendo peso) e G-HLow (tratada perdendo peso), foram novamente sincronizadas 90 dias após fornecimento de silagem de milho e aspiradas ganhando peso (em média 3,2 arrobas) compondo os grupos: G-CHigh (controle ganhando peso) e G-HHigh (tratada ganhando peso). Independente do peso, as vacas que receberam tratamento com homeopatia, apresentaram resultados significativos ($p=0,0494$) na % de blastocistos (30,5 vs 23,7%), sem afetar o número de CCO's (complexo *cumulus* oócitos) aspirados ou a taxa de clivagem. Porém,

vacas ganhando peso, independente da homeopatia, exibiram número maior ($p < 0,05$) de CCO's GI, GIII, atresícos e % de viáveis. Oócitos desnudo foi superior ($p < 0,05$) em vacas perdendo peso, independente do tratamento. Não houve efeito do tratamento ou peso sobre a concentração plasmática de progesterona ou prenhez das receptoras inovuladas. Concluímos que o uso de homeopatia em vacas da raça Nelore resulta em maior produção de blastocistos e vacas ganhando peso, tem uma maior eficiência na OPU-PIVE, independente do tratamento.

Palavras-chave: Blastocisto. Homeopatia. OPU-PIVE. Reprodução.

ABSTRACT

Use of homeopathy in Nellore cows in different nutritional states on in vitro embryo production

Production, quality and quantity of aspirated, cultured and cleaved oocytes, blastocyst production, plasma progesterone, recipient pregnancy in Nellore cows treated with homeopathy (Homeo-V Fertilidade®), and weight loss were compared. Nineteen were maintained in 2 selected groups, initially G-C (control n=09) and G-H with fertility homeopathy, n=10) after 33 days on synchronized low quality pasture and aspirated 2.5 days after weight loss (on average 1.8 arrobas) and with the groups: G-CLow (weight loss control) and G-HLow (weight loss treated) groups, were again synchronized after 90 days corn silage supply after 90 days and smart weight aspirated (on average 3.2 arrobas) composing G-CHigh (control smart weight) and G-HHigh (treated smart weight). Independents who received weight treatment with homeopathy, results⁴² ($p=0.094$) in the proportion of blastocysts (30.5 vs cows 3.7%), no success or number of COC's (*cumulus* oocyte complex) aspirated or cleavage rate. However, cows that gained weight, regardless of homeopathy, exhibited a higher number ($p<0.05$) of CCO's GI, GIII, atretics and % viable. Naked oocytes were superior ($p<0.05$) on weight loss vacations, regardless of treatment. There was no effect of treatment or weight on plasma progesterone concentration or pregnancy in in ovulated recipients. We conclude that the use of homeopathy in Nellore cows results in higher production of blastocysts and weight-optimized cows have a greater efficiency in OPU-PIVE, regardless of treatment.

Keywords: Blastocyst. Homeopathy. OPU-PIVE. Reproductio

INTRODUÇÃO

A homeopatia é um método terapêutico criado em 1796, por Samuel Hahnemann, que surgiu por meio de observações e experimentações dos efeitos dos medicamentos em homens saudáveis e tem como princípio a cura pelo semelhante (FONTES, 2005 e HAHNEMANN, 1996). Em animais, essa terapia é usada em sistemas de produção da pecuária, principalmente na orgânica, uma vez que tem a vantagem de manter o equilíbrio animal, reduzir o estresse e manter o seu bem-estar. Além de ser de fácil administração, não produz resíduos e não contamina, portanto, o meio ambiente (LOPES, 2004).

A produção *in vitro* de embriões em bovinos (PIVE) brasileira tem posição de destaque, representando cerca de 50% do total de embriões produzidos mundialmente, com um contexto comercial em expansão nos próximos anos (VARAGO et al., 2008). O Brasil vem se tornando um grande exportador deste modelo de biotecnologia para vários países latino americanos e de outros continentes, devido a sua aplicação em larga escala e o sucesso na produção (MEIRELLES et al. 2008; VIANA, 2012; VIANA et al. 2018). Tal técnica associada ao uso da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU) possibilita que oócitos imaturos aspirados de fêmeas bovinas possam ser maturados e fecundados *in vitro* com sêmen sexado ou convencional resultando em embriões viáveis à transferência para receptoras. Na pecuária de corte, o objetivo principal do desenvolvimento e aprimoramento das biotecnologias reprodutivas é elevar, a curto prazo, a eficiência reprodutiva dos animais superiores geneticamente, e assim aumentar o número de seus descendentes (HONORATO et al. 2013).

No entanto, os resultados da OPU-PIVE em termos de produção embrionária e taxa de prenhez ainda são variáveis, respectivamente 30 e 40% (CASTILHO et al., 2007) e sofre influência da época do ano, raça, grupamento sanguíneo (NOGUEIRA et al., 2021). Um outro fator importante a ser considerado na eficiência da OPU-PIVE é o estado nutricional e metabólico da doadora, que pode interferir com a secreção de hormônios reprodutivos e metabóli-

cos, padrões de crescimento folicular, e qualidade oocitária em bovinos (BARUSELLI *et al.*, 2019).

O uso da homeopatia vem crescendo muito na pecuária nos últimos anos, pela eficiência reprodutiva e diminuição de perdas no descarte de leite e carnes (CLAUSEN, ALBRECHT, MATHIE, 2013). Diferente dos tratamentos alopáticos, não há estudos que constatem efeitos colaterais com o uso de medicamentos homeopáticos (CLAUSEN, ALBRECHT, MATHIE, 2013), além de ser uma alternativa ecológica que não causa qualquer risco ambiental, melhorando a saúde de todo o sistema e reequilibrando o ambiente como um todo.

Uma das formas de melhorar os oócitos obtidos para a produção embrionária é através da suplementação das doadoras visando alterar a composição do fluido folicular e consequentemente influenciar na qualidade oocitária (GUSMÃO *et al.*, 2017). Desta forma, hipotetizamos no presente estudo que o fornecimento de Homeo-Vita fertilidade®, antes da OPU, resulta em melhora na quantidade/qualidade de oócitos, e na produção embrionária, sobretudo quando usado em vacas perdendo peso corporal.

Assim, objetivamos neste estudo avaliar em vacas da raça Nelore tratadas com homeopatia (Homeo-Vita Fertilidade®), ganhando e perdendo peso, a quantidade e qualidade de oócitos aspirados, cultivados e clivados, produção de blastocistos, progesterona plasmática e prenhez das receptoras inovuladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Local

O presente estudo foi realizado na Fazenda Experimental da UNOESTE. Localizada no município de Presidente Bernardes (SP) a 22° 28' 25"S, 51° 67' 88" W e Altitude 400m, com clima tropical, temperatura média anual variando de 15°C a 32°C. No período de Junho a Novembro 2020.

Inicialmente foram utilizadas 19 vacas da raça Nelore pesando em média 448,6 ± 58,3 Kg, idade de 1 a 7 anos, com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. As vacas foram divididas de forma sistematizada de acordo com a idade e status reprodutivo (primípara/múltipara) em 2 grupos: G-C grupo controle, n=9) e G-H (grupo tratado, n=10). Cada grupo ficou alocado em piquetes separados, medindo 0,6 hectares cada, o fornecimento do Homeo-Vita Fertilidade® (*Homeo-Vita Umarama - PR, Brasil*) composto por Aristolochia clematitis CH6, Folliculinum CH6, Ovarinum CH6, Pulsatilla nigrans CH6, Sulphur CH9 em veículo de Carbonato de cálcio era administrado na quantidade de 20g/dia/animal junto ao sal mineral, pela manhã, no trato das vacas do lote G-H, e no lote G-C, as vacas recebiam a mesma quantidade em carbonato de cálcio, porém sem o ativo homeopático. O cocho era verificado diariamente para garantir a ingestão total do produto.

Após permanecerem 33 dias em pastagem de baixa qualidade, as fêmeas foram pesadas novamente (422 ±55,4 Kg), perderam em média 1,8 arrobas, compondo assim o tratamento com perda de peso (G-Low) sendo realizada logo após a pesagem uma aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU).

Imediatamente após a OPU as vacas passaram a receber 2,5 kg/animal/dia de silagem de milho fornecida em cocho no período da manhã e no período da tarde. A avaliação bromatológica da silagem trouxe resultados de composição química, expressos na base da Matéria Seca: Matéria Seca 33,08%, Extrato Etéreo 4,97%, Matéria Mineral 9,66%, Proteína Bruta

8,10%, Nutrientes Digestivos Totais (*estimado*) 52,27%, Fibra de Detergente Neutra 72,62%, Fibra de Detergente Ácida 47,02%, Hemicelulose 25,60%

As fêmeas permaneceram por três meses recebendo silagem, durante esse período, o grupo G-H passou a receber o produto homeopático, e o grupo G-C recebeu o carbonato de cálcio (sem o ativo homeopático), na mesma quantidade (20g/animal/dia) para ambos os grupos, os produtos foram administrados misturados a silagem. Após esse período, as fêmeas foram novamente pesadas, apresentando ganho (Peso médio: 471,5 ± 56,7Kg), compondo assim o grupo ganhando peso (G-High), sendo realizada uma nova sessão de OPU seguida de ultrassom.

Sincronização da Onda Folicular

Para evitar efeito da onda folicular e fase do ciclo estral, as fêmeas de ambos os grupos antes da 1ª e 2ª OPU tiveram a onda folicular sincronizada pelo protocolo a seguir.

Em estágio aleatório do ciclo estral, no dia 0, os animais receberam implante vaginal de progesterona (*primer monodose® tecnopec São Paulo - SP, Brasil*) com aplicação intramuscular (IM) de 2 mg de benzoato de estradiol (*benzoato hc® hertape calier Juatuba - MG, Brasil*). Em ambos os grupos, no dia 8, foram retirados os implantes concomitante com a aplicação de 300 UI de eCG (gonadotropina coriônica equina, *novormon®, zoetis Campinas - SP, Brasil*), com 2,5 mL de prostaglandina (*cloprostenol sódico® ouro fino Cravinhos - SP, Brasil*) e 0,5mg de cipionato de estradiol (*e.c.p® zoetis Campinas - SP, Brasil*). A ovulação ocorre em média, 60 horas após a retirada dos implantes, portanto, 2,5 dias após a ovulação, as aspirações foliculares foram realizadas coincidindo com a emergência da nova onda folicular (CASTILHO *et al.*, 2007).

Para realizar a aspiração folicular, foi utilizada uma agulha (18 G e 58 mm) acoplada a uma bomba de vácuo, guiada por ultrassonografia transvaginal, após anestesia epidural u-

sando 4 mL de Lidocaina (*lidovet® bravet Engenho Novo - RJ, Brasil*) associada a Cloridrato de Xilazina 2% (*xilazin® syntec Santana de Parnaíba - SP, Brasil*) segundo Seneda et al., 2001.

Após a aspiração os CCO's juntamente com o fluido folicular foram depositados em tubos Falcon de 50 mL, a seguir levados para seleção em placa de petri e lupa esteromicroscópica. Os CCO's foram selecionados e avaliados quanto à qualidade de acordo com a presença de células do *cumulus* e aspecto do ooplasma em graus I, II, III, desnudo e atrésico (SENEDA *et al.*, 2001). A seguir foram depositados em criotubos contendo meio de transporte, para serem enviados para o laboratório comercial de produção *in vitro* de embriões.

No laboratório os oócitos foram maturados (MIV), fecundados (FIV) e cultivados *in vitro* (CIV) segundo Nogueira et al. (2021) adaptado para o protocolo do laboratório comercial. Cerca de 48h após os zigotos serem colocados no meio de cultivo foi avaliada a taxa de clivagem e no dia 7 pós-fecundação os blastocistos foram contados, envasados e 46 deles (23 no grupo controle e 23 no grupo tratado) transferidos para receptoras previamente sincronizadas.

Coleta de sangue e dosagem hormonal

Foi realizada uma coleta de sangue 8 dias após a aspiração folicular, por punção da veia jugular em tubo de 10 mL heparinizado (Vacutainer®), seguida de centrifugação a 1500g/10min e armazenamento do plasma em criotubos (Eppendorf®) mantidos a -20°C para posterior dosagem de progesterona pelo método de radioimunoensaio (RIA) utilizando “kit” comercial (Progesterone: MP Biomedicals, USA). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 10,3% no controle alto e 0,18% no controle baixo, com nível de sensibilidade para a detecção de 0,126 ng/mL.

Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação das receptoras foi realizado por ultrassonografia 35 dias após a inovulação dos embriões, utilizando-se equipamento de ultrassom Honda modelo HS-2000VET com transdutor transretal de 7,5 MHz.

Análise Estatística

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. A seguir para verificar o efeito do fator homeopático sobre a qualidade dos CCO's (GI, GII, GIII, desnudo e atrésico) entre os grupos (G-C vs G-H), independente do estado nutricional e no grupo de acordo com a condição corporal (G-CLow e G-HLow – perdendo peso; G-CHigh e G-HHigh – ganhando peso) foram utilizados os teste t e de Mann Whitney. O total de oócitos aspirados, a porcentagem de oócitos cultivados, porcentagem de clivagem, produção de blastocisto e prenhes foram avaliados de acordo com o grupo (G-C vs G-H) e no grupo de acordo com a condição corporal (G-CLow e G-HLow – perdendo peso; G-CHigh e G-HHigh – ganhando peso) utilizando o teste de qui-quadrado. As análises foram realizadas pelo SAS considerando 5% de significância ($p < 0,05$).

Cuidados metodológicos

Considerando que a homeopatia ainda é um tema controverso, como estratégia para minimizar riscos de viés metodológico, a aspiração folicular, a produção *in vitro*, a dosagem de progesterona, o diagnóstico de gestação das receptoras e a análise estatística dos dados tiveram uma abordagem duplo-cego, ou seja, sem conhecimento prévio do grupo experimental.

Os procedimentos experimentais estão resumidos na Fig. 1.

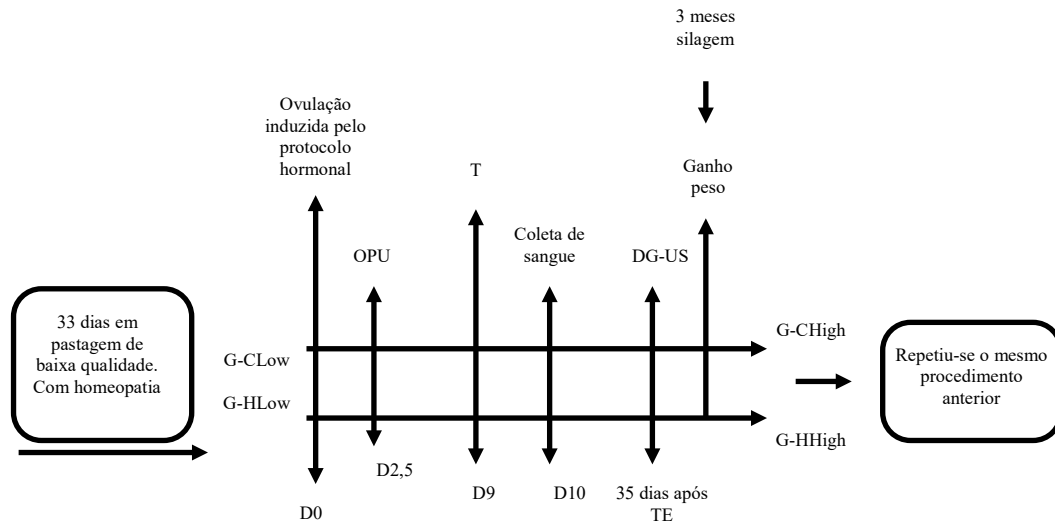


Fig. 1. Procedimento experimental realizado em vacas da raça Nelore (n=19) tratadas com Homeo-Vita Fertilidade® perdendo (G-CLow e G-HLow) e ganhando peso (G-CHigh e G-Hhigh). Após ganho de peso, repetiu-se o procedimento com as fêmeas do início (D0).

RESULTADOS

Na tabela 1 está demonstrado a qualidade dos CCO's aspirados de vacas controle e tratadas com homeopatia, % de clivados e % de blastocisto. Houve efeito significativo do uso da homeopatia no número de oócitos GII o qual foi maior ($p=0,0092$) no grupo tratado. A % de blastocistos produzidos também foi maior ($p=0,0494$) no grupo que recebeu o composto homeopático.

Tabela 1. Efeito do Homeo-Vita Fertilidade® na média±EPM da qualidade dos CCO's aspirados de vacas da raça Nelore nos grupos controle (G-C) e tratado com homeopatia (G-H).

	G-C	G-H	Valor de p
GI	3,65 ± 0,95	5,25 ± 1,26	0,3302
GII	1,88 ± 0,55	7,90 ± 2,30	0,0092
GIII	5,59 ± 0,83	9,90 ± 2,29	0,2595
Desnudo	9,63 ± 1,84	13,60 ± 2,44	0,3707
Atrésico	2,76 ± 0,68	4,05 ± 0,94	0,1459
% Viáveis*	58,86	63,50	0,1677
% clivados	66,4	69,82	0,3403
% blastocisto	23,72	30,54	0,0494

* (GI, GII e GIII).

Na tabela 2 está demonstrado o efeito do tratamento homeopático de acordo com a perda ou ganho de peso das vacas. Houve efeito significativo da condição corporal na maioria dos itens avaliados, exceto no número de oócitos GIII. Fêmeas aspiradas, independente do tratamento, ganhando peso exibiram número maior ($p<0,05$) de CCO's GI, GII, atrésicos e %

de viáveis. Ao passo que o número de oócitos desnudo foi superior ($p < 0,05$) em vacas perdendo peso, independente do tratamento.

Tabela 2. Efeito do Homeo-Vita Fertilidade® na média±EPM da qualidade dos CCO's aspirados de vacas da raça Nelore nos grupos controle perdendo (G-CLow) ou ganhando peso (G-CHigh) e tratadas com homeopatia perdendo (G-HLow) ou ganhando peso (G-HHigh).

	G-C (Controle)		Valor de p	G-H (Tratamento)		Valor de p
	G-CLow (n=10)	G-CHigh (n=10)		G-HLow (n=10)	G-HHigh (n=10)	
GI	0,50 ± 0,27	6,44 ± 1,14	0,0013	0,70 ± 0,26	9,80 ± 1,41	0,0002
GII	0,75 ± 0,49	2,89 ± 0,82	0,0474	2,60 ± 0,87	13,20 ± 3,92	0,0022
GIII	4,38 ± 1,05	6,67 ± 1,19	0,174	6,60 ± 2,10	13,20 ± 3,92	0,155
Desnudo	9,63 ± 1,84	0,67 ± 0,33	0,0005	13,60 ± 2,44	0,60 ± 0,27	0,0002
Atrésico	0,25 ± 0,16	5,00 ± 0,65	0,0005	0,70 ± 0,60	7,40 ± 0,95	<0,0001
% viáveis*	36,29	73,44	<0,0001	40,91	78,32	<0,0001
% clivados	66,36	66,44	0,989	69,91	68,77	0,785
% blastocisto	16,82	28,77	0,0273	18,98	39,30	<0,0001

* (GI, GII e GIII). Teste Mann Whitney, Teste t, Teste Q-quadrado.

Embora não houve efeito do tratamento homeopático no número oócitos cultivados ($p=0,2785$) ou clivados ($p=0,3403$), a % de blastocistos foi superior ($p=0,0494$) nas vacas

tratadas com homeopatia quando comparadas ao grupo controle, 30,5% e 23,7% respectivamente (Fig 2).

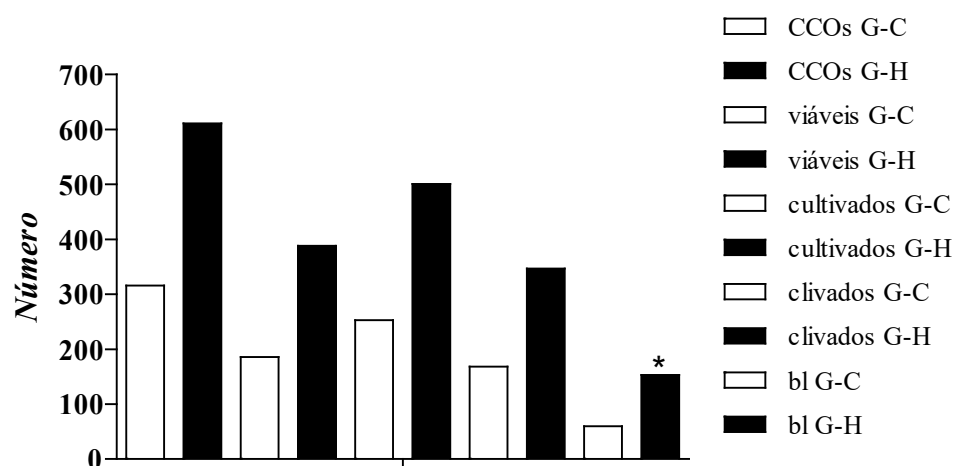


Fig. 2. Efeito do Homeo-Vita Fertilidade® na porcentagem de CCO's aspirados (CCO's cultivados ($p=0,2785$), clivados ($p=0,3403$) e blastocisto ($p=0,0493$)* de vacas da raça Nelore nos grupos controle G-C ($n=9$) e tratado com homeopatia G-H ($n=10$) avaliados pelo teste de Q-quadrado.

A concentração plasmática de progesterona avaliada 8 dias após a OPU não diferiu entre o controle e tratamento, bem como não apresentou efeito da condição corporal sobre este parâmetro (Fig. 3).

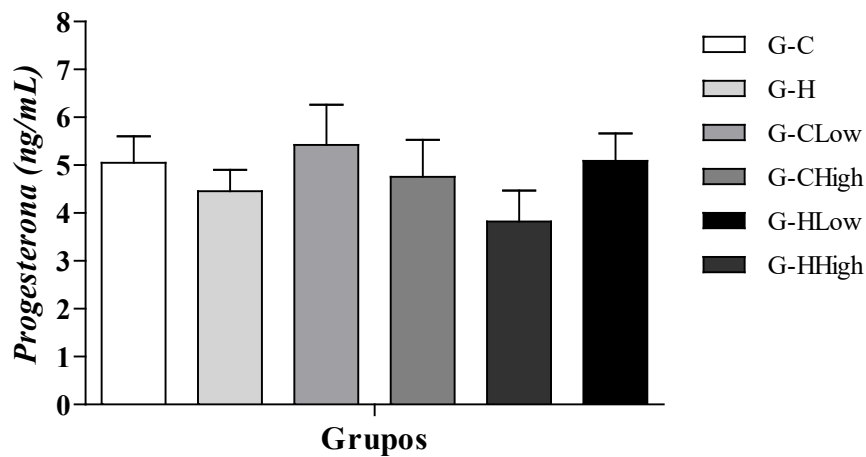


Fig. 3. Efeito do Homeo-Vita Fertilidade® na concentração plasmática de progesterona em vacas da raça Nelore nos grupos controle G-C (n=9), com homeopatia G-H (n=10) e controle perdendo (G-CLow, n=9) ou ganhando peso (G-HHigh, n=10) e tratadas com homeopatia perdendo (G-HLow, n=9) ou ganhando peso (G-HHigh, n=10).

Não houve diferença ($n=0,3745$) na taxa de prenhez de receptoras inovuladas do G-C (43,5%, 10/23) e do G-H (52,2%, 12/23). Quando levamos em consideração a condição corporal também não diferiu ($p=0,5241$) entre as receptoras dos grupos G-CLow (42,8%, 6/14) e G-HLow (64,3%, 9/14) ou entre ($p=0,6287$) os grupos G-CHigh (44,4%, 4/9) e G-HHigh (33,3%, 3/9).

DISCUSSÃO

Este estudo parece ser o primeiro a avaliar o efeito do uso da homeopatia na OPU-PIVE de bovinos. Fomos capazes de demonstrar que a homeopatia aumenta o número de blastocistos obtidos dos CCO's aspirados. Porém quando avaliamos a condição corporal, perdendo ou ganhando peso, observamos um efeito da nutrição, pois sabe-se que a nutrição influencia a atividade ovariana, e no presente estudo vacas ganhando peso apresentaram maior quantidade e qualidade oocitária, bem como maior número de blastocistos produzidos.

A Homeopatia apresenta condições de tratar qualquer ser vivo no organismo agropecuário, seja ele planta, solo, animal e homem, atingindo todos de forma holística. Segundo Orjales *et. al.*, (2016) as terapias homeopáticas são uma alternativa para reduzir os tratamentos com antibióticos na agricultura orgânica, tendo reduzido o número de tratamentos totais nas fazendas que utilizam a prática. Entretanto, a saúde integral dos rebanhos depende de práticas conjuntas que visem melhorar o desenvolvimento da resposta imune, a higiene do ambiente, o bem-estar animal, a qualidade nutricional dos alimentos e a organização por parte dos produtores rurais.

A homeopatia tem como base o tratamento com pequenas quantidades de drogas extremamente diluídas capazes de curar uma patologia (DE LIMA, *et. al.*, 2016). Utilizamos em nosso estudo um composto homeopático comercial de *Aristolochia clematitis* CH6, *Folliculinum* CH6, *Ovarinum* CH6, *Pulsatilla nigrans* CH6 e *Sulphur* CH9. Sabe-se que dinamizações baixas de hormônios (inferiores a 6 CH) são indicadas para estimular a fertilidade, as médias (7-12 CH) para regular, as altas (acima de 12 CH) podem ser usadas para frear ou regular processos relacionados a fertilidade feminina (LEGROS, 2010). Em outro estudo a eficiência do complexo homeopático (*Calcarea phosphorica*, *Aletris farinosa*, *Pulsatilla*, *Aurum muriaticum natronatum*, *Sepia* e *Phosphorus*, na potência de 30CH) foi avaliada no tratamento

de anestro em vacas, no qual houve 100% de manifestação de cio dentro de 27,5 dias em média (Rajkumar et al., 2006).

Medicamentos homeopáticos, tais como o *Folliculinum*, são usados para restaurar a fertilidade e regular o ciclo menstrual (SINSEN, 2010). De Lima et. al. (2017) observaram aumento na produção de progesterona em cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais suínos usando FSH dimanizado, porém diminuiu a produção de estradiol. Outros estudos relatam que o uso de *Folliculinum 6CH*, além de tratar desequilíbrios hormonais, também estimula a secreção de estradiol (DEMARQUE et. al., 2009; LEGROS, 2010). No entanto, Damasceno et. al., 2020 relataram que o uso do *Folliculinum 6 CH* afetou negativamente a distribuição mitocondrial em oócitos, prejudicando a retomada da meiose, e aumentou a degeneração oocitária em comparação com o grupo controle.

Vockeroth (1999), demonstrou que a onda do futuro é ter veterinários especializados em terapias complementares e convencionais, enfatizando a homeopatia. Seu estudo foi corroborado posteriormente por Weiermayer et. al. (2020), que citam estar disponíveis evidências da eficácia da homeopatia humana e veterinária em geral e, em particular, do tratamento homeopático para infecções. Especialmente, a homeopatia individualizada que tem demonstrado efeitos em todos os níveis de qualidade de acordo com os critérios Cochrane, mesmo nos estudos metodologicamente de alta qualidade. Weiermayer et. al. (2020) ainda dizem que a Organização Mundial de Saúde (OMS), juntamente com a Comissão da União Européia (EU), solicita pesquisas em medicina complementar, pois preocupam-se com a ameaça global de resistência antimicrobiana.

CONCLUSÃO

Concluimos que o tratamento homeopático em vacas da raça Nelore apresentou maior conversão de oócitos resultando em maior produção de blastocistos, sem afetar o número de CCO's aspirados ou a taxa de clivagem.

Independente da homeopatia, vacas ganhando peso, tem uma maior eficiência na O-PU-PIVE quando comparadas com fêmeas perdendo peso.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse

REFERÊNCIAS

1. Baruselli, P. S., Elliff, F. M., Silva, L. G., Catussi, B. L. C. and Bayeux, B. M. 2019. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019).
2. Castilho, C., Assis, G. S., and Garcia, J. M. 2007. Influence of diameter and follicular fase on the in vitro competence of oocytes from Nelore heifers. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, **59**(2):288–294.
3. Clausen, J., Albrecht, H. and Mathie, R. T. 2013. Veterinary clinical research database for homeopathy: placebo-controlled trials. *Complementary Therapies in Medicine*. **21**(2):115-120.
4. Damasceno, Kayse Najara Matos et al. Ultra-diluted Folliculinum 6 cH impairs ovine oocyte viability and maturation after in vitro culture. *Animal Reproduction* [online]. 2020, v. 17, n. 2 [Accessed 6 April 2022], e20190100. Available from: <<https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2019-0100>>. Epub 26 June 2020. ISSN 1984-3143. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2019-0100>.
5. Demarque D, Jouanny J, Poitevin B, Saint-Jean Y. Farmacologia e matéria médica homeopática. França: Organon; 2009.
6. Fontes OL. Farmácia homeopática: teoria e prática. 2a ed. Barueri: Manole; 2005.
7. Gusmão, A. O. M., Silva, A. R., Medeiros, M. O. 2017. A biotecnologia e os avanços da sociedade. *Biodiversidade*. **16**(1): 135-154.
8. Hahnemann S. Organon da arte de curar. São Paulo: Indústria Gráfica e Editora; 1996.
9. Honorato, M. T., Ferro, R. A. C., Ferro, D. A. C., Santos, K. J. G., Costa, M. A. and Rodrigues Filho, J. L. 2013. Importância da escolha de receptoras de um programa de transferência de embriões em bovinos. *PUBVET*, **7**: 1870-1980.
10. Legros MS. Uso da homeopatia em endocrinologia ginecológica. Uso terapêutico de hormônios diluídos e envernizados. *Rev Med Homeopat*. 2010;3:9-13.
11. de Lima LF, Rubessa M, Rocha RMP, Winters R, Milner DJ, Campello CC, Figueiredo JR, Wheeler MB. High diluted and dynamised follicle stimulating hormone modulates steroid production in isolated porcine preantral follicles cultured in vitro. *Homeopathy*. 2017 May;106(2):87-92. doi: 10.1016/j.homp.2017.03.004. Epub 2017 Apr 18. PMID: 28552178.
12. Lopes EG. Homeopatia aplicada à parasitologia veterinária. In Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 12 & Simpósio Latino Americano de RICKETSIOSES,

- L. Ouro Preto. Anais. Ouro Preto, colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 2004;150–155.
13. Meirelles, C., Faria, V., Souza, A., Weiss, R., Segui, M., and Kozicki, L. 2008. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino. *Archives of Veterinary Science*, **13**(2): 98-103.
 14. Nogueira, B. G. R., Souza, L. F. A., Puelker, R. Z., Giometti, I. C., Firetti, S. M. G., Dias, T. S. S. B. and Castilho, C. 2021. Fatores que afetam a produção *in vitro* de embriões bovinos em programa comercial. *Research, Society and Development*. **10**(2): e16110212264. doi: 10.33448/rsd-v10i2.12264.
 15. Orjales, I., López-Alonso, M., Rodríguez-Bermúdez, R., Rey-Crespo, F., Villar, A. and Miranda, M. 2016. Use of homeopathy in organic dairy farming in Spain. *Homeopathy*. **105**(1):102-108. doi: 10.1016/j.homp.2015.08.005.
 16. Rajkumar R, Srivastava SK, Yadav MC, Varshney VP, VarshneyJP, Kumar H. 2006. Effect of homeopathic complex on oestrusinduction and hormonal profile in anoestrus cows. *Homeopathy*. **95**:131–5.
 17. Seneda, M. M., Esper, C. R., Garcia, J. M., Oliveira, J. A. and Vantini, R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*. **67**(1-2):37-43.
 18. Sinsen J. Papel da homeopatia na gestão da infertilidade masculina e feminina. 2010. *Eur J Integral Med*. **2**:217-65.
 19. Varago, F. C., Mendonça, L. F., and Lagares, M. A. 2008. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, **32**: 100-109.
 20. Viana, J. H. M., Siqueira, L. G. B., Palhão, M. P., and Camargo, L. D. A. 2010. Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production, *Acta Scientiae Veterinariae*. **38**: 661-674.
 21. Viana, J. H. M., Siqueira, L. G. B., Palhao, M. P. and Camargo, L. S. A. 2018. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Animal Reproduction (AR)*. **9**(1): 12-18.
 22. Vockeroth, W. G. 1999. Veterinary homeopathy: an overview. *Can Vet J*. **40**(8): 592-594.
 23. Weiermayer, P., Frass, M., Peinbauer, T. And Ellinger L. 2020. Evidenzbasierte Veterinär-/Homöopathie und ihre mögliche Bedeutung für die Bekämpfung der Antibiotikaresistenzproblematik – ein Überblick [Evidence-based homeopathy and veterinary homeopathy, and its potential to help overcome the anti-microbial resistance problem - an overview]. *Schweiz Arch Tierheilkd*. **162**(10): 597-615. doi: 10.17236/sat00273.

ANEXO A- PARECER FINAL CEUA

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação

PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR E PROGESTERONA PLASMÁTICA DE VACAS DA RAÇA NELORE SUPLEMENTADAS COM HOMEÓ-VITA FERTILIDADE", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6314 e tendo como participante(s) TATIANE SZUCS DOS SANTOS BARROS DIAS (discente), ALICE PAIVA MAUSSON (discente), CALIE CASTILHO SILVESTRE (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 15/07/2020.

Vigência do projeto: 08/2020 a 05/2022.

ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
bovino	20	400 quilos	5 anos	F	Fazenda Experimental

Presidente Prudente, 3 de Agosto de 2020.

Prof. Dr. Air Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI

Profª Ms. Adriana Falck de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 3229-2079 – cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 18 3229-2079 – cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – 183229-2079 – ceua@unoeste.br

valide este documento em www.unoeste.br/leg informando o código de segurança **ba0ab64c7c77c597686ead8c8228ca**

ANEXO B - NORMAS DA REVISTA - THE JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE (JVMS)

Instructions for Authors

The Journal of Veterinary Medical Science (JVMS)

Revised on May 27, 2021

1. General information

The Journal of Veterinary Medical Science (JVMS) is an open access, peer-reviewed journal that covers fields in basic, applied and clinical research in veterinary science.

JVMS is the official journal of the Japanese Society of Veterinary Science and releases 12 issues per year. The journal publishes work on the following fields: Anatomy, Physiology, Biochemistry, Pharmacology, Ethology, Wildlife Science, Pathology, Toxicology, Laboratory Animal Science, Parasitology, Bacteriology, Virology, Public Health, Immunology, Epidemiology, Avian Pathology, Internal Medicine, Clinical Pathology, Surgery, and Theriogenology.

2. Types of papers

Full papers, Notes, and Review articles that are principally related to veterinary science and are unpublished and not under consideration for publication elsewhere will be accepted for publication. The length of papers, including Tables, Figures, and any other appendices, should not exceed 8 PDF pages for a *Full paper or Review article*, and 5 for a *Note*. (One PDF page corresponds to about 850 words, excluding the title, figures, and tables.)

All submitted manuscripts are examined by editors and multiple reviewers, and the Editor-in-Chief or Vice Editor-in-Chief determines their acceptance/rejection.

3. Compliance with ethical standards

Before submitting manuscripts, authors should carefully read the following ethical standards to ensure compliance with the same. Manuscripts judged by the editors and Editorial Office as not compliant with these standards may be rejected without review. Similarly, such manuscripts may be retracted even after being accepted or published.

3-1. Duplicate submission

Manuscripts submitted to JVMS should not have been previously published, are not currently in press, or under consideration for publication in other journals (even in part/any language).

However, reports by national, public, or private research institutions and research grant reports are exempted from this rule.

If any related manuscripts are under consideration for submission to other journals, currently in press, or were previously published, authors should inform the Editor-in-Chief at the time of submission. However, manuscripts that are deposited to publicly accessible preprint servers are not deemed to have previously been published (see [3-3. Preprints]).

If authors choose to submit their manuscripts to other journals prior to JVMS's final decision to accept/reject these manuscripts, they should retract the submission to JVMS first.

3-2. Originality

Submitting a manuscript to JVMS assures that the manuscript is original. JVMS screens for unoriginal content included in manuscripts using software. Authors submitting manuscripts to JVMS are considered to consent to this screening. Manuscripts lacking originality to an unacceptable level are rejected based on the editors' judgment.

3-3. Preprints

To widely disseminate research, JVMS permits authors to register their manuscripts on preprint servers officially approved by relevant research communities before or at the time of submitting these manuscripts to JVMS. This applies only to original-version manuscripts describing primary studies. Manuscripts revised based on reviewers' comments, accepted for publication, or already published in JVMS cannot be registered on preprint servers. However, there is no restriction on the registration of links to published papers on preprint servers.

3-4. Authorship

Submitting a manuscript to JVMS signifies that all co-authors have confirmed and approved the author list and final version of the manuscript. Any alteration to the author list after submission, such as adding or deleting author names, or changing the order of authors, is basically unacceptable.

3-5. Identity of images

When authors digitally manipulate or process images, revisions should be minimized and processing should be applied to entire image within the standard ranges specified by relevant research communities. Furthermore, when major revisions have been implemented, authors should clearly explain such revisions in their manuscripts. All images in each manuscript should accurately reflect original data. Authors should neither move, delete, add, nor emphasize individual parts of images. Editors have the right to request authors to submit original, unprocessed images. If authors have difficulty in submitting requested images, their manuscripts may be rejected.

3-6. Reprinting of copyrighted materials

When manuscripts contain materials to which authors themselves do not hold the copyrights, authors must obtain the relevant permission(s) from copyright holders to reprint these materials. When manuscripts contain materials that were previously published as papers, authors must obtain permission(s) from copyright holders and publishers of original articles to reprint these materials. Additionally, authors should refer to the original articles in their manuscripts. A copy of the permission(s) for reprinting should be attached when authors submit their manuscripts for the first time.

3-7. Data and materials availability

When necessary, authors should describe acceptance numbers and detailed corporate information in their manuscript to specify sources of publicly available data and materials, such as open repositories and private manufacturers.

Authors may disclose their own data and materials in supplements or display links to access open databases and digital repositories officially approved by relevant research communities from their manuscripts. These data should be available to editors and reviewers during the review process.

3-8. Animal experiments/experiments involving human biospecimens

Authors who intend to submit manuscripts describing experiments involving animals or animal biospecimens should specify that the study was conducted after approval of animal experiment committees organized within their institutions and furthermore, conformed to the guidelines established by these institutions. As the Editorial Board may inquire about the course of events, it is preferable for the authors to provide approval numbers in the manuscripts. Manuscripts judged as being ethically compromised due to animal handling or experimental methods by the Editorial Board may be rejected.

Authors who intend to submit manuscripts describing experiments involving humans or human biospecimens (including questionnaire surveys) should specify that the study processes were performed conforming to the fundamental rules listed in the Helsinki Declaration, its revised versions, or the guidelines established by authors' institutions. When necessary, authors should also explain (in their manuscripts) the method to obtain informed consent for participation in the study and the publication of its findings. Manuscripts judged as non-compliant in this respect by the Editorial Board may be rejected.

3-9. Experiments using genetically modified organisms

Authors who intend to submit manuscripts describing experiments using genetically modified organisms should specify that the study was conducted conforming to the Cartagena Protocol on Biosafety under the Convention on Biological Diversity and the guidelines established by authors' institutions. As the Editorial Board may inquire about the course of events, it is preferable for the authors to provide approval numbers in the manuscripts. However, manuscripts in countries not ratifying the Cartagena Protocol on Biosafety may be excluded from this rule.

3-10. Statistical analysis

Authors who intend to submit manuscripts describing experiments requiring statistical analysis should adopt appropriate statistical techniques and specify these methods. Manuscripts judged as errant with statistical techniques by the editors may be rejected.

3-11. Disclosure of potential conflicts of interest

To ensure transparency, all submitted manuscripts require conflict-of-interest disclosure at the time of submission. Conflicts of interest are deemed to be present when there are situations that may prevent authors from impartially conducting and reporting studies, or such situations are suspected or possible. Potential conflicts of interest include (and are not limited to) commercial or financial conflicts of interest, partnerships for commercial purposes, playing the role of a consultant, and share and capital ownerships. If any undeclared conflicts of interest are suspected in relation to submitted manuscripts, those manuscripts may be rejected based on the editors' judgment. All manuscripts should contain a conflict-of-interest disclosure statement, even if only to specify that there are none present.

Additionally, funding for the study should be explained in the ACKNOWLEDGMENTS section of each manuscript.

4. Open access

JVMS is an open access, online-only journal published in full color from Vol. 79, No. 1. (January, 2017). Articles are registered on J-STAGE, an electronic journal platform of Japan Science and Technology Agency and PubMed Central (PMC).

5. Article Publication Charge (from January 1, 2021)

JVMS charges an Article Publication Charge (APC) once an article is accepted for publication. The APC covers the costs of article edition and online hosting management, as well as indexing services. If the corresponding author is a member of the Japanese Society of Veterinary Science, the APC is JPY 16,000 for a *Full paper* or *Review article* and JPY 12,000 for a *Note*. If not, an APC of JPY 32,000 will be charged for any types of manuscript. Authors are also asked to pay the following optional APCs:

- (1) Cost of English proofreading when deemed necessary by the Editorial Board.
- (2) Charge for extra pages (JPY 15,000 per extra page).

After the online release, an APC invoice will be sent to the corresponding author by the Japanese Society of Veterinary Science. Payment should be made to the following account (Japan Post Bank Code and Numbers: 00110-0-256160; Account Name: Japanese Society of Veterinary Science). An APC will not be charged for review articles invited by the Editorial Board.

6. Publication license

The copyrights for all papers published in JVMS belong to the Japanese Society of Veterinary Science. Authors are required to sign a license form to grant permission for publishing their works in the Journal to the Japanese Society of Veterinary Science conforming to the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives 4.0 International Public License.

7. Manuscript Preparation

7-1. Text formatting

In the top margin of the first page of the manuscript, one of the following categories should be noted as the field of the research: Anatomy, Physiology, Biochemistry, Pharmacology, Ethology, Wildlife Science, Pathology, Toxicology, Laboratory Animal Science, Parasitology, Bacteriology, Virology, Public Health, Immunology, Epidemiology, Avian Pathology, Internal Medicine, Clinical Pathology, Surgery, and Theriogenology. The first page should also include details of the type of paper: *Full paper*, *Review article*, or *Note*. In addition, it should include the title, authors' names, affiliations, and the full address (including city, country, postal code) of the institution(s) where the work was done, as well as the corresponding author's name and e-mail address. A running head in capital letters not exceeding 40 letters must be provided.

The second page should contain the abstract (240 words or less for a *Full paper* or *Review article* and 120 words or less for a *Note*) and up to five key words (in alphabetical order).

For a *Full paper* or *Review article*, the text should be divided into the following sections:

INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONFLICT OF INTEREST, ACKNOWLEDGMENTS, REFERENCES, and FIGURE LEGENDS. For a *Note*, such headings are not required except for CONFLICT OF INTEREST, ACKNOWLEDGMENTS, REFERENCES, and FIGURE LEGENDS.

- The manuscript should be double-spaced (24–26 lines per page and approx. 70 letters per line) on A4 size with suitable margins (2.5 cm at the top, bottom, left, and right sides of the page).
- In the main text, consecutive page numbers on the footer and consecutive line numbers through all pages on the left margin of the page should be provided.
- Only the first letter of proper nouns should be capitalized. Scientific names for animals, plants, and microorganisms must be italicized.
- Avoid using abbreviations in the title of the paper. All abbreviations should be written in parentheses after spelling out or expanding the term in full at the first appearance in the abstract and main text.
- Arabic numerals should be used for quantities. Units and abbreviations should conform to the following examples:
M, mM, μ M, %, m, cm, mm, μ m, nm, pm, cm^2 , l, ml, μ l, kg, g, mg, μ g, ng, pg, hr, min, sec, msec, rpm, Hz, Bq, mBq, μ Bq, kBq, cpm, dpm, ppm, °C, J, KJ, lux.
- Regarding suppliers, the following information should be provided when their names initially appear in manuscripts: description (product name; corporate name, and the city

and country that the company is located in). For companies in the United States, an abbreviation of the state should follow the city.

- References should be arranged in alphabetical order by first author's surname and coauthors' surname, and numbered consecutively. For articles written by the same first author, they should be listed in the following order: (1) article by only the first author, (2) that by the first author + one coauthor, and (3) that by the first author + more than one coauthors. In the text, they should be cited by numbers in square brackets, e.g., [1], [3-5, 7]. The abbreviations of titles of periodicals should conform to ISO 4-1972 (E): Documentation International Code for the Abbreviation of Titles of Periodicals and ISO 833-1974 (E): Documentation International List of Periodical Title Word Abbreviation.
- The following are examples:
 - Beiser, J. A., Gustin, K. M., Pearce, M. B., Maines, T. R., Zeng, H., Pappas, C., Sun, X. S., Camey P. J., Villanueva, J. M., Stevens, J., Katz, J. M. and Tumpey, T. M. 2013. Pathogenesis and transmission of avian influenza A (H7N9) virus in ferrets and mice. *Nature* **501**: 556–559.
 - Hori, M., Yazama, F., Matsuura, Y., Yoshimoto, R., Kaneda, T., Yasumoto, T., Ozaki, H. and Karaki, H. 2018. Inhibition of actin polymerization by marine toxin pectenotoxin-2. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 225–234.
 - Sasaki, H., Sasaki, N., Nishino, T., Nagasaki, K., Kitamura, H., Torigoe, D. and Agui, T. 2014. Quantitative trait loci for resistance to the congenital nephropathy in tensin 2-deficient mice. *PLoS One* **9**: e99602. doi:10.1371/journal.pone.0099602.
 - Hamm, L. L., Alpern, R. J. and Preisig, P. A. 2013. Cellular mechanisms of renal tubular acidification. pp. 1917–1978. In: Seidin and Giebisch's *The Kidney*, 5th ed. (Alpern, R. J., Caplan, M. J. and Moe, O. W. eds.), Elsevier, Amsterdam.
 - Wild, D. G. 2013. *The Immunoassay Handbook*, 4th ed., Elsevier Science & Technology, Oxford.
 - Japan Pet Food Association (JPFA). 2013. Research for the number of household dog and cats in Japan. <http://www.petfood.or.jp/data/chart2013/index.html> [accessed on May 31, 2019].

7-2. Quality of English

It is essential to use American English. It is recommended that authors whose mother language is not English have their manuscripts proofread by native English speakers or proofreading service providers prior to submission. Such proofreading should be repeated after major revisions are made in the review process.

8. Manuscript submission

Manuscripts are submitted and processed using the ScholarOne Manuscripts platform (SIM): <https://mc.manuscriptcentral.com/jvms>.

Each manuscript should be uploaded and divided into the files specified below such that SIM automatically creates a single PDF file from the uploaded files. As this PDF file is used in the reviewing process, the author should confirm the absence of text garbling and sharpness of images prior to its submission.

The following files should be prepared when submitting a manuscript:

- **Text:** The text file should include a title page and a list of References: Microsoft word files are preferred; Use a regular plain 11-point font (e.g., Times New Roman, Century) (Avoid Helvetica, Arial, and Symbol).
- **Figures:** Color figures are recommended: Original files should be submitted in the following formats; PowerPoint, Word, Excel, Photoshop (PSD, JPEG, TIFF), (Avoid SHS, EXE, COM, VBS, ZIP).

Required resolutions: monochrome: 1,200 dpi; grayscale and color: 600 dpi; and photographs (not containing text): 300 dpi.

Please see the PMC Guidelines: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/>

- **Tables:** No vertical lines should be used. All phrases should begin with a capital letter, in principle. It is recommended that Excel is used to create tables. PowerPoint files are unacceptable. Each table should have a title that outlines the content.
- To make figures and tables comprehensible by themselves, all abbreviations must be defined when corresponding terms initially appear in each manuscript.
- Supplementary Tables, Figures, and Movies may be published as digital appendices.
- As PDF files automatically created with SIM are used in the reviewing process, the resolutions of figures should be adjusted to keep the file sizes at 5MB or smaller. High-resolution files should be separately submitted after acceptance.

Files should be named as follows; figure and table numbers should be inserted into these names:

Text: AuthorName.doc(x)

Figure: AuthorName_Fig1.tif (extension depends on the file)

Table: AuthorName_Table1.xls(x)

Supplemental materials: AuthorName_suppl1.xls (the extension depends on the file)

Cover letter: AuthorName_cov.doc(x)

9. After acceptance

Accepted manuscripts are published after editing and typesetting by the Editorial Office. All contact related to each accepted manuscript is made with the corresponding author. Publication is usually in the order of acceptance.

10. Inquiries

JVMS Editorial Office: jvms@ipecc-pub.co.jp

11. Notice about photocopying

To photocopy any work from JVMS, you or your organization must obtain permission from either of the following organizations that have been delegated for copyright clearance by the copyright owner of this publication:

[Except in the USA]

Japan Academic Association for Copyright Clearance. (JAACC)

6-41 Akasaka 9-chome, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

Phone: 81-3-3475-5618 FAX: 81-3-3475-5619

E-mail: info@jaacc.jp

[In the USA]

Copyright Clearance Center

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923, USA

Phone: 1-978-750-8400 Fax: 1-978-646-8600