

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO INDOXACARBE EM RATOS E GATOS

DAYANE APARECIDA FRANCISCO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO INDOXACARBE EM RATOS E GATOS

DAYANE APARECIDA FRANCISCO DA SILVA

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre- Mestrado em Ciência Animal - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira

632.951
S586a

Silva, Dayane Aparecida Francisco da.
Avaliação da mutagenicidade do indoxacarbe em ratos e gatos / Dayane Aparecida Francisco da Silva. – Presidente Prudente, 2015.

47 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Oeste Paulista – Unoeste: Presidente Prudente – SP, 2015.

Bibliografia.

Orientadora: Rosa Maria Barilli Nogueira.

1. Indoxacarbe. 2. Inseticidas. 3. Testes de Mutagenicidade. 4. Rato. 5. Gatos. I. Título.

DAYANE APARECIDA FRANCISCO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE DO INDOXACARBE EM RATOS E GATOS

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

Presidente Prudente, 16 de Setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Barilli Nogueira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Collichio Zuanaze
Faculdade de Jaguariúna - FAJ
Jaguariúna-SP

Prof^a. Dr^a. Cecília Braga Laposy
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiaram incondicionalmente em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me fez instrumento da vossa fé. Confiando Nele é possível realizar todos os nossos sonhos. Basta seguir seus ensinamentos e acreditar sempre.

À minha família, em especial aos meus pais, aqueles que são minha base e meu exemplo de vida.

Aos meus irmãos, Diego e Patrick, que mesmo distantes, sempre estiveram por perto por meio de palavras de incentivo e de carinho.

Agradeço imensamente á minha orientadora e amiga, prof^a Dr^a Rosa Maria Barilli Nogueira, pela paciência e confiança, com toda certeza possui minha grande admiração e respeito.

Fico grata a Prof^a Luciana Machado Guaberto, professora responsável pelo laboratório de genética molecular da UNOESTE, e a técnica Andressa Veronezi, pelo auxílio na leitura das lâminas.

Aos alunos de graduação do curso de Medicina Veterinária, Alan Giroto, Bruno Fabrício, Felipe Gabriel e Marcelo Salati, sem a ajuda de vocês não teria conseguido.

Aos amigos que conquistei durante esses dois anos de mestrado, os guardarei em meu coração.

*“A melhor de todas as coisas é aprender.
O dinheiro pode ser perdido ou roubado,
a saúde e força podem falhar,
mas o que você dedicou à sua mente
é seu para sempre.”
(Louis L'Amour)*

RESUMO

Avaliação da Mutagenicidade do Indoxacarbe em Ratos e Gatos

Introdução: Os pesticidas são venenos intencionalmente dispersos no ambiente para o controle de pragas e, com sua persistência nesse meio podem induzir a toxicidade em seres humanos e animais. Indoxacarbe é um inseticida, oxidiazínico, que apresenta atividade sobre insetos da ordem lepidóptera. No tratamento contra pulgas em pequenos animais, o indoxacarbe tem demonstrado uma alta atividade inseticida associada a esses ectoparasitas. A escolha da utilização dessas duas espécies animais neste estudo se deu pelo fato de que ratos e gatos apresentam uma grande quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados, facilitando desta forma a realização do ensaio escolhido e, pelo rato ser o modelo biológico padrão para avaliações de mutagenicidade, e por fim pelo fato do produto ser indicado para o uso em gatos. A escassez na literatura sobre o efeito mutagênico causado pelo uso desse produto levou a realização dessa pesquisa, cujo objetivo foi avaliar por meio do teste de micronúcleo a mutagenicidade do indoxacarbe em dose terapêutica e em dez vezes maior em ratos e gatos. **Materiais, métodos e resultados:** Foram selecionados 40 ratos, com 70 dias de idade, da linhagem Wistar, machos, peso de $280\text{g}\pm 10$ e 20 gatos adultos, sem raça definida, machos e fêmeas, com peso de $4\text{kg}\pm 200\text{gr}$, ambos do biotério central e gatil da universidade de origem, respectivamente. Os ratos foram mantidos em caixas individuais em ambiente com controle de temperatura $22^{\circ}\text{C}\pm 2$, umidade $55\%\pm 5$, fotoperíodo 12 horas claro e escuro, os gatos foram mantidos em baias individuais, e ambos com água e ração ad libitum. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com 10 animais em cada grupo de ratos e 5 animais nos grupos compostos por gatos, e foram tratados com: Grupo controle negativo (GCN)-solução de cloreto de sódio 0,9% por via tópica, em dose única. Grupo controle positivo (GCP)-ciclofosfamida em única dose de 50mg/kg por via intraperitoneal nos ratos e intravenosa nos gatos. Grupo indoxacarbe (GI)- indoxacarbe por via tópica, em dose única recomendado pelo fabricante. Grupo indoxacarbe dose alta (GIDA)-indoxacarbe por via tópica, em dose única, porém dez vezes maior que a dose recomendada pelo fabricante. Os ratos foram avaliados 24 horas após o uso do indoxacarbe, após eutanásia e retirada do fêmur para a realização da lavagem do canal medular com soro fetal bovino, posterior centrifugação, retirada do sobrenadante e realização do esfregaço. Os gatos foram avaliados por meio do teste de micronúcleo antes e 24 horas após a aplicação do indoxacarbe, através da coleta de uma gota de sangue periférico da extremidade do rabo para a realização do esfregaço. A fixação, coloração e leitura das lâminas foram semelhantes para os ratos e gatos. Os testes estatísticos utilizados foram de análise de variância com contraste pelo método de Tukey e, para a comparação entre momentos utilizou-se teste t pareado. O nível de significância adotado foi de 5%. Indoxacarbe não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das espécies e doses estudadas, mesmo nos animais submetidos a altas doses, a quantidade de micronúcleos permaneceu dentro da normalidade ($p>0,05$). **Discussão:** Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com os poucos relatos encontrados na literatura, afirmando a ausência da capacidade mutagênica do indoxacarbe em diferentes espécies animais e vias de administração do produto. Observou-se também a

rapidez, e facilidade na realização do teste para micronúcleo, caracterizando-o como um importante bioensaio para avaliações de mutagenicidade.

Palavras-chave: indoxacarbe, inseticida, teste para micronúcleo, mutagenicidade, rato, gato.

ABSTRACT

Mutagenicity Assessment of Indoxacarb in Rats and Cats

Background: Pesticides are substances used for pest control. Because of their persistence in the environment, they can induce toxicity in humans and animals. Indoxacarb is an oxadiazine insecticide that acts against insects of the order Lepidoptera. Furthermore, indoxacarb has demonstrated strong insecticide activity against fleas; therefore, it is used in ectoparasite treatment. Choice of species used in this study (rats and cats) is based on several factors such as these animals have a high count of micronucleated polychromatic erythrocytes, thereby facilitating the execution of the chosen assay; rats are the standard animal model for mutagenicity studies; and the product is intended for use in cats. Limited data in literature pertaining to the mutagenic effects of this product motivated this study. The aim of this study was to evaluate the mutagenicity of indoxacarb when administered in one and tenfold therapeutic doses in rats and cats. This evaluation was performed using the micronucleus test. **Materials, Methods & Results:** Forty male Wistar rats aged 70 days and weighing 280 ± 10 g and 20 mixed breed male and female adult cats weighing 4 ± 0.2 kg were selected. These animals were obtained from the central animal facility and cattery, respectively, of the university of origin. Rats were reared in individual cages with a controlled temperature of $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity of $55\% \pm 5\%$ and 12-h light–dark cycle. Cats were reared in individual stalls with water and food ad libitum. Animals were randomly distributed into four groups comprising 10 rats and 5 cats in respective groups: negative control group, which received 0.9% sodium chloride solution as a single topical administration; positive control group, which received 50 mg/kg cyclophosphamide as a single intra-peritoneal (rats) or intravenous injection (cats); indoxacarb group, which received indoxacarb as a single topical dose according to the manufacturer's recommendations; and high dose indoxacarb group, which also received indoxacarb in a single topical dose, but at a tenfold concentration. Rats were evaluated 24 h after indoxacarb administration. After euthanasia, rat femurs were obtained and their medullary canals were washed using fetal bovine serum. The content was centrifuged and used for smear preparations. Cats were evaluated using the micronucleus test before and 24 h after indoxacarb administration. For smear preparations, a drop of peripheral blood samples was obtained from the tail tip. Smear fixation, staining, and microscopic analysis were similar for cats and rats. Statistical analyses were performed using analysis of variance with contrast through Tukey's method and paired t test to compare time points. The significance level was 5%. Indoxacarb showed no mutagenic activity in the two species and doses evaluated. Even in animals subjected to high doses, the micronuclei count remained within the normal range ($p > 0.05$). **Discussion:** The results of this study corroborate those of other studies, where in the mutagenic capacity of indoxacarb was similar in different animal species and product delivery routes. In addition, it is of note the speed and ease of micronucleus testing, which makes it an important mutagenicity bioassay.

Keywords: indoxacarb, insecticide, micronucleus test, mutagenicity, rat, cat.

SUMÁRIO

1 ARTIGO	10
ANEXO 1 APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)	29
ANEXO 2 NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE	31

1 **1. ARTIGO**

2 **Avaliação da Mutagenicidade do Indoxacarbe em Ratos e Gatos***

3 **Mutagenicity Assessment of Indoxacarb in Rats and Cats***

4
5 Dayane Aparecida Francisco da Silva¹, Rosa Maria Barilli Nogueira², Alan Brunholi Giroto³,

6 Bruno Fabrício Teixeira³, Felipe Gabriel dos Santos Sousa³, Marcelo Salati Filho³, Cecília

7 Braga Laposy⁴ & Rogério Giuffrida⁵

8
9 *Artigo baseado em dissertação apresentada pelo autor em cumprimento aos requisitos para a

10 obtenção do grau de mestre. ¹Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. ²Departamento

11 de Clínica Médica de Pequenos Animais (CMPA). ³Faculdade de Medicina Veterinária.

12 ⁴Departamento de Patologia Clínica Veterinária. ⁵Departamento de Medicina Veterinária

13 Preventiva, Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brazil.

14 CORRESPONDENCE: D.A.F. Silva [dayaneafs@hotmail.com – Tel.: +55 (18) 3903 1758]

15 Benedito Carlos de Toledo n. 111, Jardim Nova Planaltina. CEP: 19045-470. Presidente

16 Prudente, SP, Brazil.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

RESUMO

27 **Introdução:** Os pesticidas são venenos intencionalmente dispersos no ambiente para o
28 controle de pragas e, com sua persistência nesse meio podem induzir a toxicidade em seres
29 humanos e animais. Indoxacarbe é um inseticida, oxidiazínico, que apresenta atividade sobre
30 insetos da ordem lepidóptera. No tratamento contra pulgas em pequenos animais, o
31 indoxacarbe tem demonstrado uma alta atividade inseticida associada a esses ectoparasitas. A
32 escolha da utilização dessas duas espécies animais neste estudo se deu pelo fato de que ratos e
33 gatos apresentam uma grande quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados,
34 facilitando desta forma a realização do ensaio escolhido e, pelo rato ser o modelo biológico
35 padrão para avaliações de mutagenicidade, e por fim pelo fato do produto ser indicado para o
36 uso em gatos. A escassez na literatura sobre o efeito mutagênico causado pelo uso desse
37 produto levou a realização dessa pesquisa, cujo objetivo foi avaliar por meio do teste de
38 micronúcleo a mutagenicidade do indoxacarbe em dose terapêutica e em dez vezes maior em
39 ratos e gatos.

40 **Materiais, métodos e resultados:** Foram selecionados 40 ratos, com 70 dias de idade, da
41 linhagem Wistar, machos, peso de $280\text{g}\pm 10$ e 20 gatos adultos, sem raça definida, machos e
42 fêmeas, com peso de $4\text{kg}\pm 200\text{gr}$, ambos do biotério central e gatil da universidade de origem,
43 respectivamente. Os ratos foram mantidos em caixas individuais em ambiente com controle
44 de temperatura $22^{\circ}\text{C}\pm 2$, umidade $55\%\pm 5$, fotoperíodo 12 horas claro e escuro, os gatos foram
45 mantidos em baias individuais, e ambos com água e ração *ad libitum*. Os animais foram
46 distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com 10 animais em cada grupo de ratos e 5
47 animais nos grupos compostos por gatos, e foram tratados com: Grupo controle negativo
48 (GCN)-solução de cloreto de sódio 0,9% por via tópica, em dose única. Grupo controle
49 positivo (GCP)-ciclofosfamida em única dose de 50mg/kg por via intraperitoneal nos ratos e
50 intravenosa nos gatos. Grupo indoxacarbe (GI)- indoxacarbe por via tópica, em dose única

51 recomendado pelo fabricante. Grupo indoxacarbe dose alta (GIDA)-indoxacarbe por via
52 tópica, em dose única, porém dez vezes maior que a dose recomendada pelo fabricante. Os
53 ratos foram avaliados 24 horas após o uso do indoxacarbe, após eutanásia e retirada do fêmur
54 para a realização da lavagem do canal medular com soro fetal bovino, posterior centrifugação,
55 retirada do sobrenadante e realização do esfregaço. Os gatos foram avaliados por meio do
56 teste de micronúcleo antes e 24 horas após a aplicação do indoxacarbe, através da coleta de
57 uma gota de sangue periférico da extremidade do rabo para a realização do esfregaço. A
58 fixação, coloração e leitura das lâminas foram semelhantes para os ratos e gatos. Os testes
59 estatísticos utilizados foram de análise de variância com contraste pelo método de Tukey e,
60 para a comparação entre momentos utilizou-se teste t pareado. O nível de significância
61 adotado foi de 5%. Indoxacarbe não apresentou atividade mutagênica em nenhuma das
62 espécies e doses estudadas, mesmo nos animais submetidos a altas doses, a quantidade de
63 micronúcleos permaneceu dentro da normalidade ($p>0,05$).

64 **Discussão:** Os resultados obtidos neste estudo corroboraram com os poucos relatos
65 encontrados na literatura, afirmando a ausência da capacidade mutagênica do indoxacarbe em
66 diferentes espécies animais e vias de administração do produto. Observou-se também a
67 rapidez, e facilidade na realização do teste para micronúcleo, caracterizando-o como um
68 importante bioensaio para avaliações de mutagenicidade.

69 **Palavras-chave:** indoxacarbe, inseticida, teste para micronúcleo, mutagenicidade, rato, gato.

70

71

72

73

74

75

ABSTRACT

76

77 **Background:** Pesticides are substances used for pest control. Because of their persistence in
78 the environment, they can induce toxicity in humans and animals. Indoxacarb is an oxadiazine
79 insecticide that acts against insects of the order Lepidoptera. Furthermore, indoxacarb has
80 demonstrated strong insecticide activity against fleas; therefore, it is used in ectoparasite
81 treatment. Choice of species used in this study (rats and cats) is based on several factors such
82 as these animals have a high count of micronucleated polychromatic erythrocytes, thereby
83 facilitating the execution of the chosen assay; rats are the standard animal model for
84 mutagenicity studies; and the product is intended for use in cats. Limited data in literature
85 pertaining to the mutagenic effects of this product motivated this study. The aim of this study
86 was to evaluate the mutagenicity of indoxacarb when administered in one and tenfold
87 therapeutic doses in rats and cats. This evaluation was performed using the micronucleus test.

88 **Materials, Methods & Results:** Forty male Wistar rats aged 70 days and weighing 280 ± 10 g
89 and 20 mixed breed male and female adult cats weighing 4 ± 0.2 kg were selected. These
90 animals were obtained from the central animal facility and cattery, respectively, of the
91 university of origin. Rats were reared in individual cages with a controlled temperature of
92 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity of $55\% \pm 5\%$ and 12-h light–dark cycle. Cats were reared in individual
93 stalls with water and food *ad libitum*. Animals were randomly distributed into four groups
94 comprising 10 rats and 5 cats in respective groups: negative control group, which received
95 0.9% sodium chloride solution as a single topical administration; positive control group,
96 which received 50 mg/kg cyclophosphamide as a single intra-peritoneal (rats) or intravenous
97 injection (cats); indoxacarb group, which received indoxacarb as a single topical dose
98 according to the manufacturer’s recommendations; and high dose indoxacarb group, which
99 also received indoxacarb in a single topical dose, but at a tenfold concentration. Rats were
100 evaluated 24 h after indoxacarb administration. After euthanasia, rat femurs were obtained

101 and their medullary canals were washed using fetal bovine serum. The content was
102 centrifuged and used for smear preparations. Cats were evaluated using the micronucleus test
103 before and 24 h after indoxacarb administration. For smear preparations, a drop of peripheral
104 blood samples was obtained from the tail tip. Smear fixation, staining, and microscopic
105 analysis were similar for cats and rats. Statistical analyses were performed using analysis of
106 variance with contrast through Tukey's method and paired t test to compare time points. The
107 significance level was 5%. Indoxacarb showed no mutagenic activity in the two species and
108 doses evaluated. Even in animals subjected to high doses, the micronuclei count remained
109 within the normal range ($p > 0.05$).

110 **Discussion:** The results of this study corroborate those of other studies, where in the
111 mutagenic capacity of indoxacarb was similar in different animal species and product delivery
112 routes. In addition, it is of note the speed and ease of micronucleus testing, which makes it an
113 important mutagenicity bioassay.

114 **Keywords:** indoxacarb, insecticide, micronucleus test, mutagenicity, rat, cat.

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

INTRODUÇÃO

125 Indoxacarbe é um inseticida pertencente ao grupo químico das oxidiazinas, sendo
126 considerado um substituto seguro para os organofosforados, por apresentar taxas de
127 dissipação ambiental favoráveis ao seu uso como inseticida na agricultura [16,18]. Como
128 pulicida nos mamíferos, atua causando rápida paralisia e morte da pulga pela sua ligação
129 ao canal de sódio voltagem-dependente [4,8,20].

130 Após sua bioativação por enzimas presentes no inseto, surge o metabólito JT333 (N-
131 decarbomethoxyllated) cuja ação é bloquear os canais de sódio, resultando na
132 hiperpolarização do potencial de membrana, levando a sintomas de neurointoxicação, rápida
133 interrupção da atividade alimentar, postura de ovos, seguida por paralisia e morte. Seu uso é
134 muito seguro para os mamíferos, uma vez que os canais iônicos de sódio são 1000 vezes
135 menos sensíveis aos efeitos do inseticida [4,15,16,20,28].

136 Substâncias mutagênicas possuem a capacidade de alterar processos genéticos, podendo
137 resultar em processos cancerígenos e morte celular [1,17,19]. O teste do micronúcleo é um
138 dos ensaios mais utilizados dentro da toxicologia genética, devido à sua simplicidade, baixo
139 custo e facilidade de visualização dos micronúcleos nos eritrócitos, podendo ser usado no
140 diagnóstico de doenças e no monitoramento ambiental [6,7,22].

141 O produto a base de indoxacarbe encontra-se disponível no mercado (Actvyl^{®1}) porém,
142 poucos estudos *in vivo* foram encontrados na literatura, portanto, o objetivo deste estudo foi
143 avaliar por meio do teste do micronúcleo a mutagenicidade do indoxacarbe em sua dose
144 terapêutica e em dose dez vezes maior em ratos e gatos.

145

146

147

148

149

MATERIAIS E MÉTODOS

150

151

152

153

Para o bioensaio em ratos utilizou-se 40 animais, com 70 dias de idade, da linhagem Wistar, machos, peso de $280\text{g}\pm 10$, provenientes do biotério central da universidade de origem, os quais permaneceram alojados em ambiente controlado, temperatura de $22^{\circ}\text{C}\pm 2$, umidade $55\%\pm 5$, fotoperíodo 12horas claro/escuro, com ração e água *ad libitum*.

154

155

156

Foram selecionados 20 gatos adultos, sem raça definida, machos e fêmeas, com peso de $4\text{kg}\pm 200\text{gr}$, provenientes do gatil da universidade de origem, os quais permaneceram alojados em baias individuais com ração e água *ad libitum*.

157

158

159

As diferentes espécies foram distribuídas em quatro grupos, com 10 animais em cada grupo composto pelos ratos e, 05 animais nos grupos compostos por gatos e foram tratados com:

160

161

162

- Grupo controle negativo (GCN): solução de cloreto de sódio 0,9% via tópica na região cervical dorsal, em dose única no volume de 0,03mL para os ratos e 0,5mL para os gatos.

163

164

- Grupo controle positivo (GCP): ciclofosfamida² em dose única de 50mg/Kg via intraperitoneal nos ratos e intravenosa nos gatos.

165

166

- Grupo indoxacarbe (GI): indoxacarbe¹ via tópica na região cervical dorsal, em dose única recomendada pelo fabricante (0,128mL/Kg).

167

168

169

- Grupo indoxacarbe dose alta (GIDA): indoxacarbe via tópica na região cervical dorsal, em dose única dez vezes maior que a dose recomendada pelo fabricante de acordo com o peso do animal.

170

171

Teste do micronúcleo em medula óssea nos ratos

172

173

Os ratos foram submetidos a esse ensaio após 24 horas da aplicação do produto, todos os procedimentos foram seguidos conforme o método descrito por Schmid [25]. Após a

174 eutanásia realizada em câmara de gás com inalação de dióxido de carbono (CO²)³, o fêmur foi
175 removido, e a sua epífise proximal foi cortada com o auxílio de uma tesoura e, introduzido 1
176 mL de soro fetal bovino⁴ que em seguida foi aspirado. Essa suspensão foi homogeneizada
177 com o auxílio de uma pipeta Pasteur e depois centrifugada⁵ a 392G durante 5 minutos. O
178 sobrenadante foi descartado e o botão de células homogeneizadas. Uma gota da suspensão
179 celular foi transferida para uma lâmina previamente limpa para a realização do esfregaço, e
180 em seguida secagem do material em temperatura ambiente. Para a coloração utilizou-se o
181 corante Giemsa⁶ diluído em solução tampão fosfato com pH 6,8, na proporção de 1:10,
182 durante 15 minutos.

183 Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada para remoção do
184 excesso de corante e deixadas secar a temperatura ambiente. De acordo com Ribeiro et al
185 [23], a coloração serve para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito
186 normocromático (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens se coram de azul claro e
187 eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha.

188 Para a determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos
189 policromáticos por animal (1000 em cada lâmina), a leitura foi cega e sempre realizada pela
190 mesma pessoa. A fotomicrografia foi obtida utilizando microscópio Leica DM750⁷ no
191 aumento de 400x com leitura feita por zona, sendo a zona marginal (onde há predomínio de
192 células maiores) e interna (maior quantidade de células menores) do corpo do esfregaço,
193 sendo contado em média três campos por cada zona. Foram considerados micronúcleos,
194 estruturas menores de um terço de diâmetro do núcleo associado, os quais são resultantes de
195 fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos
196 no núcleo principal. Sendo assim, o micronúcleo representa perda de cromatina em
197 consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano do aparelho mitótico
198 [19].

199 *Teste do micronúcleo em sangue periférico nos gatos*

200 Os animais foram submetidos à coleta de uma gota de sangue da extremidade da cauda
201 antes e após 24 horas da aplicação do produto, e esta foi transferida para uma lâmina
202 previamente limpa e identificada, e deste modo realizada a extensão. O material foi submetido
203 à fixação por meio da utilização de metanol por 10 minutos. Os procedimentos relacionados à
204 coloração e leitura das lâminas foram similares aos realizados nos grupos dos ratos.

205

206 *Análise estatística*

207 O pressuposto de normalidade dos dados dos ratos foi verificado com o teste de Levene.
208 Para determinar se os grupos experimentais destes animais diferiram entre si, quanto a
209 variável micronúcleo, foi utilizada a análise de variância em uma via (ANOVA one-way) com
210 contrastes pelo método de Tukey, essas análises foram conduzidas no software Biostat 5.3 [3].

211 Para determinar se as contagens de micronúcleos dos gatos diferiram entre grupos
212 recorreu-se a análise de variância com contrastes pelo método de Tukey e validação dos
213 pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias, respectivamente
214 pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene. Dentro de cada grupo, os momentos zero e 24 horas
215 foram comparados pelo teste t pareado. As análises foram desenvolvidas no software SPSS v.
216 16.0, ambas as análises adotaram valor de 5% de significância [10].

217

218

RESULTADOS

219 Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na comparação entre o GI, GIDA
220 e GCN, no entanto todos estes grupos diferiram significativamente ($p < 0,05$) quando
221 comparados ao GCP (figura 1), o qual expressou aumento nas médias de eritrócitos
222 micronucleados (tabelas 1 e 2).

223

224

DISCUSSÃO

225 Os resultados obtidos neste estudo, indicam a não mutagenicidade do composto
226 indoxacarbe em ratos e gatos submetidos ao tratamento com dose terapêutica e dez vezes a
227 dose por via tópica, corroborando desta forma com a escassa informação encontrada na
228 literatura que relata a ausência de capacidade mutagênica e/ou carcinogênica desta substância
229 testada em diferentes espécies e vias de administração [9,26] (Gudi. R. & Shadley. E, dados
230 não publicados) (San. R.H.C. & Clarke, dados não publicados).

231 Na literatura, relata-se que a exposição a xenobióticos pode resultar em danos
232 genéticos, sendo a mutação descrita como a alteração genuína do processo envolvido na
233 formação de neoplasias e, que pode ser induzida externa ou internamente ao organismo. Os
234 ensaios biológicos para avaliar o potencial carcinogênico de determinadas substâncias vêm
235 sendo realizados com o objetivo de identificar os efeitos decorrentes de mutações genéticas,
236 cromossômicas e de lesões na estrutura bioquímica do DNA [21,23,24].

237 O teste do micronúcleo é considerado um teste padrão na genética toxicológica e, como
238 alternativa, pode ser feito em medula óssea ou em células do sangue periférico, podendo
239 através desta última forma ter a vantagem de obter-se repetidas amostras de um mesmo
240 animal em diferentes momentos de avaliação [1,5,19]. Este teste detecta agentes clastogênicos
241 ou que interferem na formação do fuso mitótico alterando a distribuição equitativa dos
242 cromossomos durante a divisão celular [6,22].

243 Neste estudo, observou-se a facilidade na reprodução, rapidez e baixo custo para a
244 realização do teste de micronúcleo, concordando com outros estudos em que esse ensaio foi
245 utilizado como ferramenta para a avaliação de substâncias potencialmente mutagênicas como
246 também na monitorização de pacientes sob risco carcinogênico [6,27].

247 A quantidade considerada normal de eritrócitos micronucleados, observadas em
248 amostras de sangue periférico, podem diferir entre as espécies, como também entre diferentes
249 idades [12,13].

250 Algumas espécies quando jovens possuem seu sistema retículo-endotelial imaturo,
251 desta forma acumulando eritrócitos micronucleados espontâneos, e quando adultos com seu
252 sistema totalmente maduro esta quantidade cai [2]. Em estudos realizados com répteis, aves e
253 mamíferos para determinação da frequência de eritrócitos micronucleados, com o objetivo de
254 propo-los como biomonitores de dano genotóxico ou mutagênico, as espécies de mamíferos
255 com valores mais elevados a cada 10.000 eritrócitos foram os ratos, girafa, gato, hamster,
256 gambá e porco [2,12,13].

257 Em outros estudos onde ratos, gatos e cães foram expostos ao indoxacarbe por via oral,
258 observou-se rapidez na metabolização e degradação do composto, fator que contribuiu para
259 sua segurança, além desses novos inseticidas reconhecerem de forma eficaz as diferenças
260 fisiológicas entre insetos e mamíferos, organismos não alvos do controle químico [9,16].

261 Foi observado no GCP onde utilizou-se a ciclofosfamida na dose de 50mg/kg
262 quantidade de micronúcleos acima dos valores normais para as espécies, desta forma como
263 relatado por Primo et al. [21], esse quimioterápico e imunossupressor usado na mesma dose
264 como neste estudo possui potente ação mutagênica causada por seus metabólitos e, é devido a
265 esse potencial mutagênico que esse agente químico é muito utilizado como controle positivo
266 nos testes de mutagenicidade/antimutagenicidade [14].

267 As espécies utilizadas neste estudo (rato e gato) foram selecionadas por possuírem uma
268 quantidade maior de micronúcleos mesmo em idade adulta, por serem utilizados como
269 modelo padrão de ensaios de mutagenicidade e pelo fato da substância em estudo estar sendo
270 indicada e usada como ectoparasiticida em felinos domésticos [11,12].

271 Considerando os resultados obtidos sugere-se que novos estudos utilizando outras
272 técnicas de avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade sejam realizados.

273

274

CONCLUSÃO

275 O indoxacarbe não apresentou efeito mutagênico pelo teste de micronúcleo, em ratos e
276 gatos tratados com a dose indicada pelo fabricante, e com dose dez vezes maior pela via
277 tópica em dose única.

278

279 MANUFACTURERS

280 ¹MSD Saúde Animal. São Paulo, SP, Brazil.

281 ²Asta Médica Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

282 ³Beiramar. São Paulo, SP, Brazil.

283 ⁴Cutilab. Campinas, SP, Brazil.

284 ⁵Fanem. São Paulo, SP, Brazil.

285 ⁶Merck. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

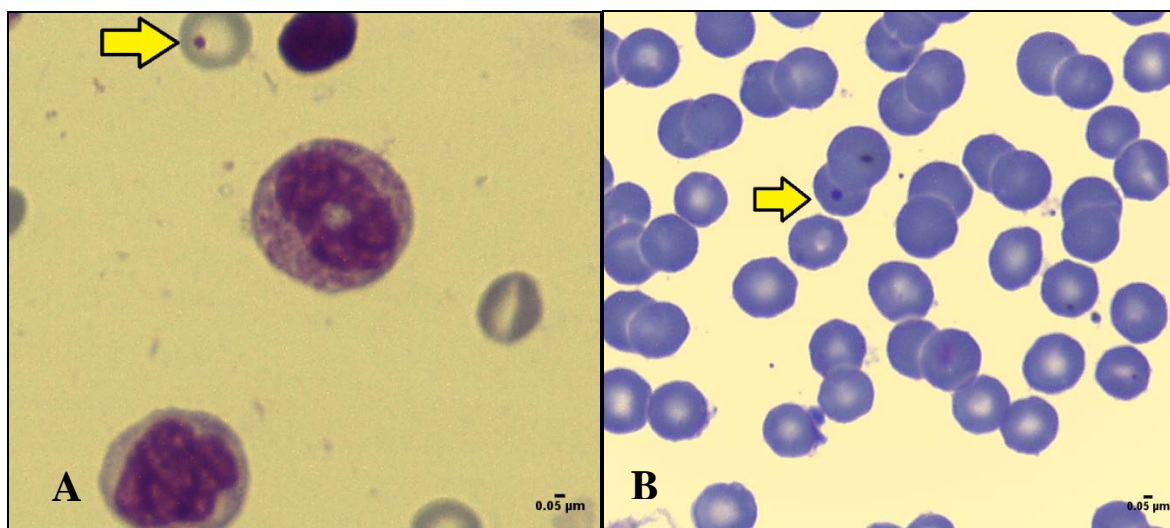
286 ⁷Aotec Instrumentos Científicos Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

287 ***Ethical Approval.*** All procedures were approved by the Ethics Committee in Animal
288 Experimentation at the Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)-CEUA (protocol n.
289 2447).

290 ***Declaration of interest.*** The authors report no conflicts of interest.

291

292



293

294 **Figura 1.** Micronúcleo em eritrócito policromático (setas). Coloração Giemsa, aumento de
295 400x (bar= 0,05µm). **A)** Esfregaço de células de medula óssea de rato exposto ao indoxacarbe
296 em dose alta (GIDA). **B)** Esfregaço de sangue periférico de gato exposto ao indoxacarbe em
297 dose alta (GIDA).

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312 **Tabela 1.** Valores das médias e desvios-padrão da contagem de micronúcleos nos eritrócitos
 313 policromáticos dos ratos no grupo controle negativo (GCN), grupo controle positivo (GCP),
 314 grupo indoxacarbe (GI) e grupo indoxacarbe em dose alta (GIDA), momento vinte quatro
 315 horas após a aplicação do produto (n=10).

GRUPOS	MOMENTOS
	24 horas após aplicação
GCN	$1,50 \pm 0,70^a$
GCP	$5,10 \pm 2,46^b$
GI	$1,36 \pm 0,82^a$
GIDA	$0,91 \pm 0,39^a$

316 Letras minúsculas comparam grupos dentro de um mesmo momento.

317 Letras distintas $p < 0,05$

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332 **Tabela 2.** Valores das médias e desvios-padrão da contagem de micronúcleos nos eritrócitos
 333 policromáticos dos gatos no grupo controle negativo (GCN), grupo controle positivo (GCP),
 334 grupo indoxacarbe (GI) e grupo indoxacarbe em dose alta (GIDA) antes e 24 horas após à
 335 aplicação do produto (n=5).

GRUPOS	MOMENTOS	
	Antes da aplicação (média±dp)	24 horas após aplicação (média±dp)
GCN	1,74 ± 0,72 ^{Aa}	2,46 ± 0,39 ^{Aa}
GCP	1,76 ± 0,76 ^{Aa}	4,26 ± 0,43 ^{Bb}
GI	1,60 ± 1,14 ^{Aa}	1,73 ± 0,63 ^{Aa}
GIDA	2,00 ± 0,70 ^{Aa}	2,13 ± 1,05 ^{Aa}

336 Letras maiúsculas comparam momentos dentro de um mesmo grupo.

337 Letras minúsculas comparam grupos dentro de um mesmo momento.

338 Letras distintas p<0,05.

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351 *Unpublished data.*

352 Gudi. R. & Shadley. Microbiological Associates, Inc., Rockville, Maryland, USA.

353 San. R.H.C. & Clarke. Microbiological Associates, Inc., Rockville, Maryland, USA.

354

355

REFERENCES

356 **1 Abramsson-Zetterberg L., Grawe J. & Zetterberg G. 1999.** The micronucleus test in rats
357 erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of
358 ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. *Mutation*
359 *Research.* 423: 113-124.

360 **2 Antonio C.D., Sergio M.G., Francisco E.V., Socorro S.M., Fernando C.D., Humberto**
361 **M.C. & Bladimir P.P. 2012.** La prueba de micronúcleos em sangue como bioindicador de
362 genotóxicos. *Abanico Veterinario.* 2(2): 43-54.

363 **3 Ayres M. 2007.** *BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e*
364 *médicas.* 4.ed. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 364p.

365 **4 Blagburn B.L. & Dryden M.W. 2009.** Biology, treatment and control of flea and tick
366 infestations. *Veterinary Clinics of North America.* 39(6): 1173-1200.

367 **5 Cammerer Z., Elhajouji A., Kirsch-Volders M. & Suter W. 2007.** Comparison of the
368 peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to
369 aneugens after single-dose applications. *Mutagenesis.* 22(2): 129-134.

370 **6 Choy W.N. 2001.** *Genotoxic and non-genotoxic mechanisms of carcinogenesis.* New York:
371 Marcel Dekker, 406p.

372 **7 Costa R.M.A. & Menk C.F.M. 2000.** Biomonitoramento de mutagênese ambiental.
373 *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 3: 24-26.

- 374 **8 Dryden M.W., Payne P.A., Smith V., Heaney K. & Sun F. 2013.** Efficacy of indoxacarb
375 applied to cats against the adult cat flea, *Ctenocephalides felis*, flea eggs and adult flea
376 emergence. *Parasites & Vectors*. 6: 126.
- 377 **9 European Medicine Agency. 2011.** Science Medicine Healthy. *Activyl*, 17p. Available in:
378 <<http://www.ema.europa.eu/ema/>>. Access in 02/2015.
- 379 **10 Field A. 2012.** *Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics*. 4.ed. London: Sage
380 Publications, 952p.
- 381 **11 González G.Z., Muñoz M.P.R., Bugarén O.T., Jiménez J.P., Mora A.R., Perez A.Z.,**
382 **Arreola M.P.G. & Corona J.S. 1998.** Induction of micronuclei in the domestic cat (*Felis*
383 *domesticus*) preripheral blood by colchicine and cytosine-arabinoside. *Mutation Research*.
384 413: 187-189.
- 385 **12 González G.Z., Bugarín O.T., Perez A.Z., Meda B.C.G., Ibarra M.L.R., González**
386 **S.M., Rodríguez A.G., Aguirre J.L., Mora A.R., Lira D.O. & Arreola M.P.G. 2000.**
387 Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals,
388 reptiles and birds): Party two. *Mutation Research*. 467: 99-103.
- 389 **13 González G.Z., Bugarín O.T., Perez A.Z., Meda B.C.G., Ibarra M.L.R., González**
390 **S.M., Rodríguez A.G., Aguirre J.L., Mora A.R., Lira D.O. & Arreola M.P.G. 2001.**
391 Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animal
392 including humans spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutation Research*. 494: 161-167.
- 393 **14 Lourenço J.A., Pitangui C.P., Jordão A.A., Vannuchi H. & Cecchi A.O. 2010.**
394 Ausência de mutagenicidade e antimutagenicidade do extrato obtido das flores do ipê roxo
395 [*Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl.]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*.
396 12(4): 414-420.

- 397 **15 Martinelli S., Montagna M.A., Picinato N.C., Silva F.M.A. & Fernandes O.A. 2003.**
398 Eficácia do indoxacarb para o controle de pragas em hortaliças. *Horticultura Brasileira*.
399 21(3): 501-05.
- 400 **16 McCann S.F., Annis G.D., Shapiro R., Piotrowski D.W., Lawhm G.P., Log J.K., Lee**
401 **K.C., Hughes M.M. & Myers B.J. 2001.** The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new
402 class of pyrazoline-type insecticides. *Pest Management Science*. 57(2): 153-164.
- 403 **17 McElroy K.M., Blagburn B.L., Breitschwert E.B., Mead P.S. & McQuiston J.H. 2010.**
404 Flea-associated zoonotic diseases of cats in the USA: Bartonellosis, flea-borne rickettsioses,
405 and plague. *Trends Parasitology*. 26(4): 197-204.
- 406 **18 Moraes B.S., Loro V.L., Pretto A., Fonseca M.B., Menezes C., Marchezan E.,**
407 **Reimche G.B. & Avila L.A. 2009.** Os parâmetros toxicológicos e metabólicos dos peixes
408 teleósteos (*Leporinus obtusidens*), em resposta a herbicidas comerciais contendo clomazone e
409 propanil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 95: 57-62.
- 410 **19 Perez A.Z., Meda B.C.G., Ibarra M.L.R., González C.M.B., Aguirre J.L., Rodriguez**
411 **A.G., Ávila J.L.R. & González G.M.Z. 2008.** Los felinos: ¿Una alternativa em estudios de
412 toxicología genética?. *Revista de Biología Tropical*. 56(2): 969-974.
- 413 **20 Prasanna L., Rao S.M., Singh V., Kujur R. & Gowrishankar. 2008.** Indoxacarb
414 poisoning: Anusual presentation as methemoglobinemia. *Indiana Journal Critical Care*
415 *Medicine*. 12: 198-200.
- 416 **21 Primo M.S., Calliari C.M., Gómez R.J.H.C., Mauro M.O., Mantovani M.S & Oliveira**
417 **R.J. 2010.** Avaliação da mutagenicidade de um biopolímero extraído do microorganismo
418 *Agrobacteriumradiobacter* em camundongos Swiss. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
419 20(3): 340-347.

- 420 **22 Rabello-Gay M.N., Rodrigues M.A.R. & Monteleone-Neto R.M.N. 1991.** *Mutagênese,*
421 *teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação.* Ribeirão Preto: Revista
422 Brasileira de Genética, 246p.
- 423 **23 Ribeiro L.R., Salvadori D.M.F. & Marques E.K. 2003.** *Mutagênese ambiental.* Canoas:
424 Ulbra, 356p.
- 425 **24 Ribeiro D.A., Lima P.L., Marques M.E. & Salvadori D.M. 2006.** Lack of DNA damage
426 induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet)
427 assay. *Brazilian Dental Journal.* 17: 91-94.
- 428 **25 Schmid W. 1975.** Micronucleus test. *Mutation Reserch.* 31: 9-15.
- 429 **26 United States Environmental Protection Agency. 2000.** *Office of prevention, pesticides*
430 *and toxic substances,* 17p. Available in: <http://www.epa.gov/>. Access in 02/2015.
- 431 **27 Valadares M.C., Castro N.C. & Cunha L.C. 2007.** *Synadenium umbellatum:*
432 *citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos.* *Revista*
433 *Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 43(4): 631-638.
- 434 **28 Wing K.D., Sacher M., Kagaya Y., Tsurubuchi Y., Mulderig L., Connair M. & Schnei**
435 **M. 2000.** Bioactivation and mode of action of the oxidiazine indoxacarb in insects. *Crop*
436 *Protection.* 19(8): 537-545.

ANEXO I
APROVAÇÃO DO TRABALHO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE
ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE DO OESTE PAULISTA (UNOESTE)

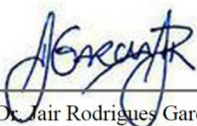
UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

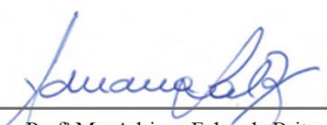
Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "**HEMOGRAMA, BIOQUÍMICA SÉRICA E TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÃES E GATOS TRATADOS COM INDOXACARBE**", cadastrado na Coordenadoria Central de Pesquisa (CCPq) sob o número nº **2447** e tendo como participante(s) **ROSA MARIA BARILLI NOGUEIRA** (responsável), **ALAN BRUNHOLI GIROTO** (discente), **DAYANE APARECIDA FRANCISCO DA SILVA** (discente), 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.

Presidente Prudente, 7 de Julho de 2015.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CCPq



Prof. Ms. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

ANEXO 2**NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE**

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS ASV – 15

OBJECTIVES: *Acta Scientiae Veterinariae* (formerly Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS) [vol. 1 (1973) - vol. 29 (2001)] is dedicated to publish retrospective and prospective scientific studies on Veterinary Medicine addressing medical, clinical, pathological, epidemiological, surgical, immunological, diagnostic and therapeutic subjects on Veterinary Medicine, apart from original papers on physiology, biochemistry, immunohistochemistry, genetics, molecular biology and cell biology applied to the domains of Veterinary Medicine and of its interface with Public Health.

METHODOLOGY OF MANUSCRIPT EVALUATION

Manuscripts are initially to be sent for a preliminary assessment by the Editorial Board. Manuscripts that do not meet the specific publication standards defined by ASV will not be accepted. **An abstract is compulsory, with a total of 3,400 characters minimum or 3,900 characters maximum, including spaces and excluding keywords).** The abstract follows a structured mode and should be written in three sections: *Background* (a short section with 700 characters maximum, including spaces) stating importance and the study's objectives; *Materials, Methods & Results*, and *Discussion*.

Note: Author/authors (Manuscripts with 10 authors or more will not be accepted for publication in ASV). Who recently have published an article in ASV may submit another manuscript for review **ONLY** after the Editorial Board has issued a decision on the publication/rejection of the first article. **One or more authors of one same manuscript may publish two articles a year in ASV (review and case reports excluded).**

PRELIMINARY CONSIDERATIONS

Authors are expected to inform the Editorial Board of the presence of material that has been previously published in the submitted manuscript, in which case the previously published paper should be included as a reference therein. Authors are fully responsible for concepts and opinions presented and discussed in all papers submitted to *Acta Scientiae Veterinariae*. All papers submitted to *Acta Scientiae Veterinariae* are to be accompanied by a letter signed by all authors as a scanned document and sent by e-mail, appointing one corresponding author. The Editorial Rules of *Acta Scientiae Veterinariae* have been defined in accordance with the instructions adopted by several journals in the field of Biomedicine. Please take extra care to ensure that your submission complies with the following style and ethical guidelines.

Authorship contributions: All people defined as author and co-authors should be qualified as such. Each author is expected to take legal responsibility for the content of the submitted paper. Authorship is acknowledged based on the substantial contribution related to the following aspects: (i) Paper design and project or data analysis and evaluation; (ii) writing or critical comments that are relevant from the intellectual standpoint; and (iii) approval of the final version to be published. The members of the research team that prepared the submitted paper and who do not fit into these criteria may be listed in the Acknowledgements section.

Note: Manuscripts containing information related to the experimental use of animals must clearly state that the studies complied with relevant professional and institutional animal welfare policies. Authors are required to inform an approval statement (process number) by an ethics committee of the institution in which the research was carried (Ethical Approval).

Summary of paper presentation requirements:

- All papers must be typed in Times New Roman font size 12 and double spaced throughout (including figure legends and references). Margins should be 2.5 cm;
- Line numbers must be exhibited on the left margin. All lines must be numbered;
- Cover-Page that includes the full title (with no more than 60 words), name(s) and affiliation(s) of all author(s), the name, telephone/ fax numbers and email address of the designated corresponding author (Correspondence), ABSTRACT (three sections) and a list of up to **six** keywords.
- Paper sections should be ordered as follows: Text (Do not use, sentences with “we...” or “our...” subdivided into sections = Introduction (with maximum of 1,700 characters including spaces); Materials and Methods; Results; Discussion and Conclusion(s). Sources and Manufacturers (when necessary); *Funding* (optional); *Acknowledgements* (optional); *Ethical Approval* (when necessary); *Declaration of Interest* and References.
- Supply electronic files of all figures (**Do not embed the figure in the text**). The figures must be presented in a size larger than that of the final montage for publication (which is at least 8 cm and at most 17 cm in width).
- Permission to reproduce previously published material must be included.
 - A term of copyright transfer must be included in all papers.

NOTE: Submit the material only to: actascivet@ufrgs.br Papers are published in order of approval for publication.

TYPES OF PAPERS

REVIEW PAPER: Review articles are requested by the Editorial Board or examined for publication through an author’s own initiative. The authors of a review article should be **experts on the subject of the review**, as proved by papers published and by citations of their own published papers in the submitted review. The authors of a review article have to send a preliminary proposal for the review. This proposal has to contain: Abstract (Background; Review and Discussion), a list of up to six keywords, and a sequential and numbered description of the topics that are to be addressed in the review, which should be prepared based on the maximum limit of 120 references. The standard format available online should be observed. It is essential that the authors of a review article are cited as authors of at least 10 other articles addressing the same subject as the review article submitted (**five** of which have to have been published in journals with impact factor 1 or higher, and the other articles in journals with minimum impact factor of 0.5). In the reference list, authors who have written or co-written na article cited in the review article submitted are required to place **the impact factor of the respective journal in bold, after the number of pages**.

RESEARCH ARTICLE: An Original Article should present a previously unpublished clear hypothesis and data (according to an appropriate experimental design, when such is the case). Writing style should be concise but clear enough to afford to reproduce the experimental methodology as described. The Discussion section should be understandable considering the general context of the subject researched, affording the means to reach conclusions based on the data obtained or observed. An Original Paper should not normally exceed 15 pages in length nor contain over 60 references.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

1. Abstract: The Abstract should be concisely written in the past tense, in accordance to the character limits (3,400 minimum - 3,900 maximum, including spaces), emphasizing the importance of the research subject, the objectives of the paper and containing a brief description of the experiment, the results obtained, specific data and the respective statistical meaning (if possible) and the main conclusions. The abstract should condense all sections of the paper. Never start with the objectives of the paper. The abstract should be followed by up to 6 keywords.

2. Introduction: This section should be briefly, clearly and objectively written, containing information that explains the importance of the paper. References cited in the introduction should address the specific research topic. The introduction should always end with the objective(s) of the paper, and should not exceed the limit maximum of 1,700 character including spaces.

Citations of References in the text: In the text, as a rule references are usually represented by Arabic numerals in square brackets, corresponding to the respective authors arranged and numbered in alphabetical order. Examples of reference representations in the text are: [2], [7,9,16], [23-27,31,33,45-48]. However, in situations where the mention of authors' names is essential (in a few cases), please observe the following suggestions: "The first description was made by Author & Author [3]..."; "Author & Author [32] started the ..."; "In 1958, Author *et al.* [18]...". Unpublished data and personal communications should be represented as: (Author, personal communication, year) and (Author & Author, unpublished data). E-mail or mail addresses of authors of personal communications and of unpublished data should be informed before the References section.

3. Materials and Methods: This section should present all information that affords the reproducibility of the experimental procedure. Wellknown methods and techniques should only be mentioned, while new methodologies should be described in detail. Whenever appropriate, chemicals and equipment are to be cited using superscript numbers, whose manufacturers are to be presented in a subsection called "Sources and Manufacturers" When animals are used in the experiments, the ethical conduct recommended by the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals should be observed, according to the Council for International Organization of Medical Sciences (executive Secretary C.I.O.M.S., c/o W.H.O., Via Appia, CH, 1211, Geneva 27, Switzerland).

Note on the statistical treatment of data: Whenever possible, authors should quantify and present the results using the appropriate statistical measurements, like confidence intervals, for instance. Authors are required to avoid resorting solely to statistical hypotheses, such as the use of *P* values, since this approach leaves out important quantitative information. The choice of the individuals that became the object of the research should be explained, the method should be detailed. The possible complications related to the treatment should be given. Computer softwares used should be mentioned.

4. Results (separate from the Discussion section): This section should provide clear and concise information only about the *relevant observations* that, depending on the nature of the research paper, should present a statistical analysis. The content should be informative instead of interpretative and, if necessary, tables, figures or other self-explanatory illustrations are to be provided. Legends should contain enough details to afford the full comprehension of figures and tables without having to resort to the text. Complex results should be expressed in graphics instead of tables that contain excessive minor details. The results should be presented in an orderly sequence, and following the sequence of the Methods section upon which the results are based. It is important to carefully plan the tables and figures to ensure that their sequencing is compatible with the text. The text should complement the figures or tables, not repeat the same information.

Tables: Are to be numbered using Arabic numerals. **No table is to be sent embedded in the main text file.** Each table should be presented in a separate file. All tables should be cited in the text in numerical ascending order. An approximate position of each table should be presented on the margin of the respective page. Tables should be self-explanatory and contain a descriptive title (place and date are to be included, when necessary). Details concerning table data should be indicated by letters or symbols, which are to be listed in an orderly manner and explained as a table footnote. With a view to avoiding long tables containing a large number of dispersed data of little importance, authors are required to consider the presentation of only the most important data in tables. Statistical measurements like confidence intervals, standard deviation etc. should be identified.

Figures: Color (CMYK) or gray scale figures have to be sent as digital 300-dpi TIFF files saved on a CD to be sent to ASV, irrespective of digital software. **No image is to be sent embedded in the main text file.** Photographs of microscopy images should contain a scale bar embedded. Symbols, arrows and letters used in photomicrography should be inserted so as to afford clear contrast against the image background, and a scale bar should be provided according to the magnification informed in the figure legend. Digital photographs should be taken using a camera with maximum resolution (minimum 5 megapixels). Images should never be sent as JPG or GIF files.

Measurement units: All measurements should be expressed as IS (International System) units. Temperature is expressed as Celsius degrees, blood pressure as millimeters of mercury. All hematological and biochemical values should be presented as decimal metric system units, according to the International Measurement System (IS). The Editorial Board may request the authors to use alternative units that do not belong to the IS to express values, before publication.

Abbreviations: Authors should avoid using abbreviations. When these are employed, authors are required to use standard abbreviations which should be defined as of the first citation of the term (the exception are measurement units). Considering Latin species names, the genus portion of the name should be abbreviated after the first citation (except in the beginning of a sentence). Abbreviations should not be used in the title and, if possible, authors are not to use abbreviations in the Abstract.

5. Discussion: The content of the Discussion section should be interpretative. The hypotheses and suppositions formulated based on the data obtained in the paper should be related to the current knowledge on the topic published in other studies. The Discussion should cite only the essential references. Authors are required to discuss the implications of the data obtained and the respective limitations, also mentioning the representativeness of such information in the conduction of future research.

6. Conclusion(s): The conclusions of the paper should be linked to the respective objectives. They should be strictly based on the results obtained in the research and on facts that are fully backed by these results. Authors are specifically required to refrain from commenting on economic benefits and expenses, unless the manuscript includes economic analysis and information.

7. Manufacturers: These notes are used to inform the origin of commercial products by citing manufacturer, city and country. These notes should be numbered consecutively as superscript numerals and appear after the Conclusion's section.

8. Funding. Authors are required to remember that financial support and grants are to be mentioned in this section.

9. Acknowledgements. Should be brief and address the significant technical cooperation and orientation by colleagues in the conduction of the study.

10. Ethical approval. Authors are required to inform an approval statement (process number) by an ethics committee of the institution in which the research was carried.

11. Declaration of interest. Conflict-of-interest may be personal, commercial, political, academic or financial. It is particularly important for authors to provide a full and complete disclosure of any financial relationship with a commercial organisation that may have an interest in the contents of the submitted manuscript.

12. References: Papers submitted to *Acta Scientiae Veterinariae* shall not be reviewed when references are incomplete or not in accordance with the journal's standards. Reference research papers should be numbered in **alphabetical order**, as follows:

Number - Surname (the first letter in capitals) followed by initials in capital letters followed by a dot (names of authors should be separated by commas, except the last author's name,

which should be preceded by an ampersand) - Year of publication - Title of the paper - Full name of the journal of publication (in italic type, with no abbreviation) - volume (issue): pages-pages.

Examples of references

• Papers

→ WITH TWO AUTHORS:

Canto S.P. & Mello J.R. 2002. Avaliação de seis protocolos pré-anestésicos para anestesia epidural de caninos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 30: 11-20.

→ WITH SEVERAL AUTHORS:

Silva A.M., Flores E.F., Weiblen R., Botton S.A., Irigoyen L.F., Roehe P.M., Brum M.C.S. & Canto M.C. 1998. Infecção aguda e latente em ovinos inoculados com o herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 18: 99-106.

Note 1: References are numbered in alphabetical order considering the surnames of authors, instead of year of publication.

For example:

7 Berlinguer F., Leoni G., Bogliolo L., Pintus P.P., Rosati I., Ledda S. & Naitana S. 2004.

8 Bernardi M.L., Cotinot C., Payen E. & Delouis C. 1996. 9 Bernardi M.L. & Delouis C. 1995.

10 Bernardi M.L. & Delouis C. 1996.

11 Bernardi M.L., Fléchon J-E. & Delouis C. 1996.

26 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A., Par-rilla J.L., Vazquez J.L. & Day B.N. 2002.

27 Martinez E.A., Vazquez J.M., Roca J., Lucas X., Gil M.A. & Vazquez J.L. 2001.

28 Martini R. L. 1998.

29 Matthijsa A., Hakze R., Potsma A. & Woelders H. 2000.

30 Matthijsa A., Harkema W., Engel B. & Woelders H. 2000.

68 Tervit H.R., Whittingham D.G. & Rowson L.E.A. 1972.

69 Thompson J.G. 1997.

70 Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H. & Tervit H.R. 1995.

71 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Donnelly P.E. & Tervit H.R. 1990.

72 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A. & Tervit H.R. 1992.

73 Thompson J.G., Simpson A.C., Pugh P.A., Wright R.W. & Tervit H.R. 1991.

Note 2: In the occurrence of references with identical sequence of authors' names, identical year of publication and different journals, these references should be listed according to the order of citation in the manuscript. If these reference papers have been published also by the same journal, consider the chronological order.

→ PUBLISHED IN A VOLUME SUPPLEMENT:

Pier A.C., Cabañes F.J., Chermette R., Ferreiro L., Guillot J., Jensen H.E. & Santurio J.M. 2000. Prominent animal mycoses from various regions of the world. *Medical Mycology*. 38 (Suppl 1): 47-58.

→ PAPER PUBLISHED IN JOURNAL NUMBER WITHOUT INDICATION OF VOLUME

Turan L., Wredmark T. & Fellander-Tsai I. 1995. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clinical of Orthopedic*. (320): 110-114.

→ PAPER PUBLISHED WITHOUT INDICATION OF JOURNAL NUMBER NOR VOLUME:

Schulman R.L. 2003. Insulin and other therapies for diabetes mellitus. *Veterinary Medicine*. April: 334-347.

→ PAPER PUBLISHED IN ELECTRONICA FORMAT:

Morse S.S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*. 1: 7-15. [Fonte: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>>].

→ PAPER IN PRESS:

Teifke J.P., Driemeier D. & Kaden V. 2002. Arrest of meta-physeal ossification with classical swine fever. *Veterinary Record*. [in press].

→ PAPER PUBLISHED IN EVENT PROCEEDINGS:

[authors are required to always include number of event, city and country]

Bortolozzo F.P., Uemoto D.A., Wentz I. & Pozzobon M.C. 1999. Reproductive performance of gilts submitted to artificial insemination in different intervals before ovulation. In: *Proceedings of the 4th International Conference on Board Semen Preservation* (Beltsville, U.S.A.). pp.239-240.

→ PAPER PUBLISHED IN COLLECTION OR SERIES:

Jellieff D.B. 1968. Evaluación del estado de nutrición dela comunidad. Ginebra: Organizacion Mundial de la Salud. [Serie de Monografias, 53], 201p.

• ABSTRACTS

[Authors are required to always include number of event, city and country]

→ PUBLISHED IN ANNALS:

Bisol J.F.W., Vieira M.J., Keller A., Mattos R.C. & Gregory R.M. 2000. Efeito da adição de antibióticos ao diluente de sêmen resfriado equino na fertilidade de éguas. In: *Resumos do XII Salão de Iniciação Científica da UFRGS* (Porto Alegre, Brasil). p.125.

→ PUBLISHED IN ANNALS OF SEVERAL VOLUMES:

Barcellos D.E.S.N., Razia L.E. & Borowski S.M. 2002. Microagglutination test detecting antibodies against *Bra-chyospira pilosicoli* [paper 537]. In: *Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society*. v.2. (Ames, U.S.A.). p.362.

→ PUBLISHED IN JOURNALS:

Reischak D., Costa U.M., Moojen V. & Ravazzolo A.P. 1999. Ovine synovial membrane cell line permissive to *in vitro* caprine lentivirus replication [abstract A-097]. In: *Virologica 99* (Curitiba, Brazil). *Virus Reviews & Research*. 4(1): 81-82.

• THESES / DISSERTATIONS

Machado M.L.S. 2001. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. 82f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

• BOOKS

[Authors are required to inform city and publishing company of the book]

→ CHAPTER IN BOOK WITH AUTHORSHIP:

Rodrigues J.L. 1982. Transferência Embrionária. In: Mies Filho A. (Ed). *Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial*. 5.ed. Porto Alegre: Sulina, pp.710-720. [mencionar o Ed ou Eds]

→ REFERENCE TO A CHAPTER IN AN EDITED BOOK:

Solomon S.E. & Nascimento V.P. 1994. Hen's eggshell structure and function. In: *The Microbiology of the Avian Egg*. London: Chapman & Hall, pp.1-24.

→ CITATION IN A BOOK:

Bladh W. H. 1971. *Nuclear Medicine*. 2nd edn. New York: Mac Graw-Hill, 858p.

• **TECHNICAL REPORTS / BULLETINS**

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 1982. Censo Demográfico: Dados Distritais. Rio de Janeiro. v.1. IBGE, 20p.

World Health Organization. 1994. Expert Committee on Drug Dependence. Geneva. 29th Report . Geneva. (WHO Technical Report Series, 856).120p.

• **OTHER MODALITIES OF REFERENCES**

▪ *Letter to the editor:* **Enzensberger W. & Fischer P.A. 1996.** Metronome in Parkinson's disease. *Lancet*. 347: 1337. [Letter]

▪ *Editorial:* **Singer M.V., Gyr K. & Sarles H. 1985.** Revised classification of peritonitis. *Gastroenterology*. 89: 683-685. [Editorial]

▪ *Editorial:* **Cancer in South Africa/Editorial/. 1994.** *South Africa Medical Journal*. 84: 15. [Editorial]

▪ *Electronic document (internet):* **United States Food and Drug Administration. 2003.** Center for Food Safety & Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual Online*. *Salmonella*, 13p. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acessado em 04/2003.

▪ *Electronica document (CD or floppy disk):* **Pereira R.L., Wolkmer P., Lopes S.T.A., Cunha C.M.S., Silva J.H.S. & Cecin M. 2003.** Comparação de métodos de avaliação da glicose sérica em cães. In: *Anais do XXIV Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA*(Belo Horizonte, Brasil). 1 CD-ROM.

EXAMPLES OF REFERENCES - ASV'S STANDARDS

Example 1

1 Benitah N. 2006. Canine nasal aspergillosis. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 21: 82-88.

2 Cadwallader J.A., Goulden B.E., Baxter M., Wyburn R.S. & Alley M.R. 1973. Rhinitis and sinusitis involving *Aspergillus fumigatus* in a dog. *New Zealand Veterinary Journal*. 21: 229-233.

3 Davey T.N. 2003. Aspergilose. In: Tilley L.P. & Smith Jr. F.W.K. (Eds). *Consulta veterinária em 5 minutos, espécies canina e felina*. 2.ed. São Paulo: Manole, pp.460-461.

4 Day M.J. 2009. Canine sino-nasal aspergillosis: parallels with human disease. *Medical Mycology*. 47(Suppl 1): s315-s323.

5 De Lorenzi D., Bonfanti U., Masserdotti C., Caldin M. & Furlanello T. 2006. Diagnosis of canine nasal aspergillosis by cytological examination: a comparison of four different collection techniques. *Journal of Small Animal Practice*. 47: 316-319.

6 Harvey C.E. & O'Brien J.A. 1983. Nasal aspergillosis and penicilliosis. In: Kirk R.W. (Ed). *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp.236-240.

- 7 Hawkins E.C. 2006.** Distúrbios da Cavidade Nasal. In: Nelson R.W. & Couto C.G. (Eds). *Medicina interna de pequenos animais*. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.219- 230.
- 8 Johnson L.R., Drazenovich T.L., Herrera M.A. & Wisner E.R. 2006.** Results of rhinoscopy alone or in conjunction with sinuscopy in dogs with aspergillosis: 46 cases (2001-2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 228: 738-742
- 9 Kohn B., Kittner A., Werner H., Schmitz S., Rudolph R. & Brunnberg L. 2002.** Nasal aspergillosis in dogs - diagnosis and therapy. *Kleintierpraxis*. 47:415-426.
- 10 Lane J.G., Clayton-Jones D.G., Thoday K.L. & Thomsett L.R. 1974.** The diagnosis and successful treatment of *Aspergillus fumigatus* infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 15: 79-87.
- 11 Mathews K.G. 2004.** Fungal Rhinitis. In: King L.G. (Ed). *Textbook of respiratory disease in dogs and cats*. Missouri: Saunders, pp.284-293.
- 12 Mathews K.G., Davidson A.P., Roplik P.D., Richardson E.F., Komtebedde J., Pappagianis D., Hector R.F. & Kass P.H. 1998.** Comparison of topical administration of clotrimazole through surgically versus nonsurgically placed catheters for treatment of nasal aspergillosis in dogs: 60 cases (1990-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 213: 501-506.
- 13 Menezes E.A., Trindade E.C.P., Costa M.M., Freire C.C.F., Cavalcante M.S. & Cunha F.A. 2004.** Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceará, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 46: 133-137.
- 14 Mezzari A., Perin C., Santos Jr. S.S. & Bernd L.A.G. 2002.** Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 44: 269-272.
- 15 Mortellaro C.M., Della Franca P.D. & Caretta G. 1989.** *Aspergillus fumigatus*, the causative agent of infection of the frontal sinuses and nasal chambers of the dog. *Mycoses*. 32: 327-335.
- 16 Peeters D. & Clercx C. 2007.** Update on Canine Sinonasal Aspergillosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 37: 901-916.
- 17 Pomrantz J.S., Johnson L.R., Nelson R.W. & Wisner E.R. 2007.** Comparison of serologic evaluation via agar gel immunodiffusion and fungal culture of tissue for diagnosis of nasal aspergillosis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 230: 319-323.
- 18 Saunders J.H. & Van Bree H. 2003.** Diagnosis of nasal aspergillosis in the dog. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. 72: 399-408.
- 19 Sharp N.J.H. 1998.** Aspergillosis and Penicilliosis. In: Greene C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, pp.714-722.
- 20 Tasker S., Knottenbelt C.M., Munro E.A., Stonehewer J., Simpson J.W. & Mackin A.J. 1999.** Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 40: 473-478.
- 21 Turek M.M. & Lana S.E. 2007.** Canine nasosinal tumors. In: Withrow S.J. & MacEwen E.G. (Eds). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4th edn. Philadelphia: Saunders Company, pp.525-539.

- 22 von Biberstein S.E., Spiro J.D. & Coll W. 1999.** Acinic cell carcinoma of the nasal cavity. *Otolaryngology – Head and Neck Surgery*. 120: 759-762.
- 23 Wilson D.W. & Dungworth D.L. 2002.** Tumors of the respiratory tract. In: Meuten D.J. (Ed). *Tumors in Domestic Animals*. 4th edn. Iowa: Blackwell, pp.365-399.
- 24 Windsor R.C., Johnson L.R., Herrgesel E.J. & De Cock H.E. 2004.** Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 224: 1952-1957.
- 25 Wolf A.M. 1992.** Fungal diseases of the nasal cavity of the dog and cat. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 22: 1119-1132.
- 26 Wuiermattei D.L. & Flo G.L. 1999.** *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*. 3rd edn. Philadelphia: W.B. Saunders, 743p.
- 27 Zchwarz P.D. 1993.** Fracture biomechanics of the apendicular skeleton: causes and assessment. In: Bojrab M.J., Smeak D.D. & Bloomberg M.S. (Eds). *Disease mechanisms in small animal surgery*. Philadelphia: Lea & Febiger, pp.1009-1026.

Example 2

- 1 Beltran M.P. & Vasconcelos J.L.M. 2008.** Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60: 580-586.
- 2 Bender R.W., Nascimento A.B., Souza A.H., Ayres H., Araújo R.R., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2011.** Effect of treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) on day 5 after timed artificial insemination (TAI) on fertility in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 94(E-Suppl.1): 62.
- 3 Bisinotto R.S., Chebel R.C. & Santos J.E.P. 2010.** Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93: 3578-3587.
- 4 Breuel K.F., Spitzer J.C. & Henricks D.M. 1989.** Systemic progesterone concentration following human chorionic-gonadotropin administration at various times during the estrous-cycle in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 67: 1564-1572.
- 5 Brusveen D.J., Cunha A.P., Silva C.D., Cunha P.M., Sterry R.A., Silva E.P., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2008.** Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91: 1044-1052.
- 6 Brusveen D.J., Souza A.H. & Wiltbank M.C. 2009.** Effects of additional prostaglandin F-2 alpha and estradiol-17 beta during Ovsynch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92: 1412-1422.
- 7 Bulman D.C. & Lamming G.E. 1978.** Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acyclicity in dairy cows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 54: 447-458.
- 8 Carter F., Forde N., Duffy P., Wade M., Fair T., Crowe M.A., Evans A.C.O., Kenny D.A., Roche J.F. & Lonergan P. 2008.** Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*. 20: 368-375.

- 9 Carter F., Rings F., Mamo S., Holker M., Kuzmany A., Besenfelder U., Havlicek, V., Mehta J.P., Tesfaye D., Schellander K. & Lonergan P. 2010.** Effect of elevated circulating progesterone concentration on bovine blastocyst development and global transcriptome following endoscopic transfer of in vitro produced embryos to the bovine oviduct. *Biology of Reproduction*. 83: 707-719.
- 10 Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Amstalden M., Baez-Sandoval G.M., Oliveira L.J., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.** Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: II. Ovarian and uterine responses. *Journal of Dairy Science*. 94: 3352-3365.
- 11 Cerri R.L.A., Chebel R.C., Rivera F., Narciso C.D., Oliveira R.A., Thatcher W.W. & Santos J.E.P. 2011.** Concentration of progesterone during the development of the ovulatory follicle: I. Ovarian and embryonic responses. *Journal of Dairy Science*. 94: 3342-3351.
- 12 Chebel R.C., Al-Hassan M.J., Fricke P.M., Santos J.E.P., Lima J.R., Martel C.A., Stevenson J.S., Garcia R. & Ax R.L. 2010.** Supplementation of progesterone via controlled internal drug release inserts during ovulation synchronization protocols in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93: 922-931.
- 13 Christenson R.K., Ford J.J. & Redmer DA. 1985.** Metabolic-clearance and production-rates of estradiol and progesterone during pubertal and postpubertal development in gilts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 75: 247-253.
- 14 Clemente M., de la Fuente J., Fair T., Al Naib A., Gutierrez-Adan A., Roche J.F., Rizos D. & Lonergan P. 2009.** Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138: 507-517.
- 15 Cunha A.P., Guenther J.N., Maroney M.J., Giordano J.O., Nascimento A.B., Bas S., Ayres H. & Wiltbank M.C. 2008.** Effects of high vs. low progesterone concentrations during Ovsynch on double ovulation rate and pregnancies per AI in high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91(Suppl 1): 246.
- 16 Dawson F.L.M. 1954.** Progesterone in functional infertility of cattle. *Veterinary Records*. 66: 324-326.
- 17 Denicol A.C., Lopes Jr. G., Mendonça L.G.D., Rivera F.A, Guagnini F., Perez R.V., Lima J.R., Bruno R.G.S., Santos J.E.P. & Chebel R.C. 2012.** Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 95: 1794-1806.
- 18 De Silva A.W.M.V., Anderson G.W., Gwazdauskas F.C., McGilliard M.L. & Lineweaver J.A. 1981.** Interrelationships with estrous behavior and conception in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 64: 2409-2418.
- 19 Diaz F.J., Anderson L.E., Wu Y.L., Rabot A., Tsai S.J. & Wiltbank M.C. 2002.** Regulation of progesterone and prostaglandin F₂alpha production in the CL. *Molecular Cellular Endocrinology*. 191: 65-80.
- 20 Fischer-Tenhagen C., Thiele G., Heuwieser W. & Tenhagen B.A. 2010.** Efficacy of a Treatment with hCG 4 days After AI to Reduce Pregnancy Losses in Lactating Dairy Cows After Synchronized Ovulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 45: 468-472.
- 21 Forde N., Beltman M.E., Duffy G.B., Duffy P., Mehta J.P., O'Gaora P., Roche J.F., Lonergan P. & Crowe M.A. 2011.** Changes in the endometrial transcriptome during the

bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction*. 84: 266-278.

22 Funston R.N., Lipsey R.J., Geary T.W. & Roberts A.J. 2005. Effect of administration of human chorionic gonadotropin after artificial insemination on concentrations of progesterone and conception rates in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 83: 1403-1405.

23 Ghanem M.E., Nakao T., Nakatani K., Akita M. & Suzuki T. 2006. Milk progesterone profile at and after artificial insemination in repeatbreeding cows: effects on conception rate and embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals*. 41: 180-183.

24 Gumen A., Guenther J.N. & Wiltbank M.C. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 86: 3184-3194.

25 Hanlon D.W., Davidson P.J., Hittmann A.R. & Joe A.K. 2005. Supplementing previously treated anestrous dairy cows with progesterone does not increase firstservice conception rate. *Theriogenology*. 63: 239-245.

26 Hanlon D.W., Jarratt G.M., Davidson J.P.J., Millar A.J. & Douglas V.L. 2005. The effect of hCG administration five days after insemination on the first service conception rate of anestrous dairy cows. *Theriogenology*. 63: 1938-1945.

27 Herlihy M.M., Giordano J.O., Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Keskin A., Nascimento A.B., Guenther J.N., Gaska J.M., Kacuba S.J., Crowe M.A., Butler S.T. & Wiltbank M.C. 2012. Presynchronization with Double-Ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95(7): 7003-7014.

28 Herrick J.B. 1953. Clinical observation of progesterone therapy in repeat breeding heifers. *Veterinary Medicine*. 48: 489-490.

29 Howard J.M., Manzo R., Dalton J.C., Frago F. & Ahmadzadeh A. 2006. Conception rates and sérum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 95: 224-233.

30 Hunter R.H.F. 2005. The Fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity? *Reproduction, Nutrition and Development*. 45: 281-290.

31 Inskeep E.K. 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*. 82(E-Suppl): E24-39.

32 Janson P.O., Damber J.E. & Axen C. 1981. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 63: 491-497.

32 Kendall N.R., Flint A.P.F. & Mann G.E. 2009. Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Veterinary Journal*. 181: 158-162.

34 Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 1997. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 80: 1288-1295.

- 35 Larson S.F., Butler W.R. & Currie W.B. 2007.** Pregnancy rates in lactating dairy cattle following supplementation of progesterone after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 102: 172-179.
- 36 Larson J.E., Krisher R.L. & Lamb G.C. 2011.** Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. *Reproductio, Fertility and Development*. 23: 311-318.
- 37 Lemley C.O., Wilmoth T.A., Tager L.R., Krause K.M. & Wilson M.E. 2010.** Effect of a high cornstarch diet on hepatic cytochrome P450 2C and 3A activity and progesterone half-life in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 93: 1012-1021.
- 38 Lonergan P., Woods A., Fair T., Carter F., Rizos D., Ward F., Quinn K. & Evans A. 2007.** Effect of embryo source and recipient progesterone environment on embryo development in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*. 19: 861-868.
- 39 Mann G.E. & Lamming G.E. 1999.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 34: 269-274.
- 40 Martins J.P.N., Policelli R.K., Neuder L.M., Raphael W. & Pursley J.R. 2011.** Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F-2 alpha of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 94: 2815-2824.
- 41 McNeill R.E., Sreenan J.M., Diskin M.G., Cairns M.T., Fitzpatrick R., Smith T.J. & Morris D.G. 2006.** Effect of systemic progesterone concentration on the expression of progesterone-responsive genes in the bovine endometrium during the early luteal phase. *Reproduction Fertility and Development*. 18: 573-583.
- 42 Moreira F., de la Sota R.L., Diaz T. & Thatcher W.W. 2000.** Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 78: 1568-1576.
- 43 Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F. & Thatcher W.W. 2001.** Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 84: 1646-1659.
- 44 Morris D. & Diskin M. 2008.** Effect of progesterone on embryo survival. *Animal*. 2: 1112-1119.
- 45 Murray M. 1991.** Microsomal cytochrome-P450-dependent steroid metabolism in male sheep liver – Quantitative importance of 6-beta-hydroxylation and evidence for the involvement of a P450 from the IIA subfamily in the pathway. *Journal of Steroid Biochemistry Mollecular Biology*. 38: 611-619.
- 46 Murray M. 1992.** Participation of the a cytochrome P450 enzyme from the 2C subfamily in progesterone 21-hydroxylation in sheep liver. *Journal of Steroid Biochemistry Mollecular Biology*. 43: 591-593.
- 47 Nascimento A.B., Souza A.H., Guenther J.N., Dalla Costa F.P., Sartori R. & Wiltbank M.C. 2012.** Effects of treatment with human chorionic gonadotrophin or intravaginal progesterone-releasing device after AI on circulating progesterone concentrations in lactating dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*. [in press].
- 48 Nasser L.F., Sá Filho M.F., Reis E.L., Rezende C.R., Mapletoft R.J., Bo G.A. & Baruselli P.S. 2011.** Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following

superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 76: 320-327.

49 Niswender G.D., Juengel J.L., Silva P.J., Rollyson M.K. & McIntush E.W. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiology Review*. 80: 1-29.

50 O'Shea J.D., Rodgers R.J. & D'Occhio M.J. 1989. Cellular composition of the cyclic corpus luteum of the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 85: 483-487.

51 Parr R.A., Davis I.F., Miles M.A. & Squires T.J. 1993. Liver blood-flow and metabolic-clearance rate of progesterone in sheep. *Research Veterinary Science*. 55: 311-316.

52 Ribeiro E.S., Bisinotto R.S., Favoreto M.G., Martins L.T., Cerri R.L., Silvestre F.T., Greco, L.F., Thatcher W.W. & Santos J.E. 2012. Fertility in dairy cows following presynchronization and administering twice the luteolytic dose of prostaglandin F2 α as one or two injections in the 5-day timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*. 78: 273-284.

53 Rivera F.A., Mendonça L.G.D., Lopes G., Santos J.E.P., Perez R.V., Amstalden M., Correa-Calderon A. & Chebel R.C. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*. 141: 333-342.

54 Robinson N.A., Leslie K.E. & Walton J.S. 1989. Effect of treatment with progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 72: 202-207.

55 Sangsritavong S. 2002. Studies of steroid metabolism in dairy cattle. 90f. Madison, WI. (PhD Dissertation – Dairy Science) - University of Wisconsin, USA.

56 Sangsritavong S., Combs D.K., Sartori R.F., Armentano

L.E. & Wilbank M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 β in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 85(12): 2831-2842.

57 Santos J.E.P., Thatcher W.W., Pool L. & Overton M.W. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin, on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 79(12): 2881-2894.

58 Schmitt E.J.P., Diaz T., Barros C.M., delaSota R.L., Drost M., Fredriksson E.W., Staples C.R., Thorner R. & Thatcher W.W. 1996. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Animal Science*. 74: 1074-1083.

59 Shams-Esfandabadi N., Shirazi A., Mirshokrai P. & Bonyadian M. 2007. Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *Pakistan Journal of Biology Science*. 10: 2709-2713.

60 Silva C.C., Groome N.P. & Knight P.G. 1999. Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115: 381-388.

61 Silva C.C. & Knight P.G. 2000. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of *in vitro* matured oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115: 381-388.

- 62 Smith D.L., Stinefelt B.M., Blemings K.P. & Wilson M.E. 2006.** Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *Journal of Animal Science*. 84: 1102-1109.
- 63 Souza A.H., Ayres H., Ferreira R.M., Wiltbank M.C. 2008.** A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 70: 208-215.
- 64 Souza A.H., Gumen A., Silva E.P.B., Cunha A.P., Guenther J.N., Peto C.M., Caraviello D.Z. & Wiltbank M.C. 2007.** Supplementation with estradiol-17 beta before the last gonadotropin-releasing hormone injection of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90: 4623-4634.
- 65 Souza A.H., Silva E.P.B., Cunha A.P., Gumen A., Ayres H., Brusveen D.J., Guenther J. N. & Wiltbank M.C. 2011.** Ultrasonographic evaluation of endometrial thickness near timed AI as a predictor of fertility in high-producing dairy cows. *Theriogenology*. 75: 722-733.
- 66 Sreenan J.M. & Diskin M.G. 1983.** Early embryonic mortality in the cow - its relationship with progesterone concentration. *Veterinary Records*. 112: 517-521.
- 67 Sterry R.A., Welle M.L. & Fricke P.M. 2006.** Treatment with gonadotropin-releasing hormone after first timed artificial insemination improves fertility in noncycling lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 89: 4237-4245.
- 68 Stevenson J.S., Portaluppi M.A., Tenhouse D.E., Lloyd A., Eborn D.R., Kacuba S. & DeJarnette J.M. 2007.** Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *Journal of Dairy Science*. 90: 331-340.
- 69 Stevenson J.S. & Pulley S.L. 2012.** Pregnancy per artificial insemination after presynchronizing estrous cycles with the Presynch-10 protocol or prostaglandin F(2 α) injection followed by gonadotropin-releasing hormone before Ovsynch-56 in 4 dairy herds of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 95: 6513-6522.
- 70 Stevenson J.S., Pursley J.R., Garverick H.A., Fricke P.M., Kesler D.J., Ottobre J.S. & Wiltbank M.C. 2006.** Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *Journal of Dairy Science*. 89: 2567-2578.
- 71 Stevenson J.S., Tenhouse D.E., Krisher R.L., Lamb G.C., Larson J.E., Dahlen C.R., Pursley J.R., Bello N.M., Fricke P.M., Wiltbank M.C., Brusveen D.J., Burkhart M., Youngquist R.S. & Garverick H.A. 2008.** Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *Journal of Dairy Science*. 91: 2901-2915.
- 72 Stormshak F., Inskoop E.K., Lynn J.E., Pope A.L. & Casida L.E. 1963.** Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. *Journal of Animal Science*. 22: 1021-1026.
- 73 Stronge A.J. H., Sreenan J.M., Diskin M.G., Mee J.F., Kenny D.A. & Morris D.G. 2005.** Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1212-1224.

- 74 Villarroel A., Martino A., BonDurant R.H., Deletang F. & Sischo W.M. 2004.** Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology*. 61: 1513-1520.
- 75 Waldmann A., Reksen O., Landsverk K., Kommisrud E., Dahl E., Refsdal A. & Ropstad E. 2001.** Progesterone concentrations in milk fat at first insemination - effects on non-return and repeat-breeding. *Animal Reproduction Science*. 65: 33-41.
- 76 Walton J.S., Halbert G.W., Robinson N.A. & Leslie K.E. 1990.** Effects of progesterone and human chorionic-gonadotropin administration 5 days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. 54: 305-308.
- 77 Willard S., Gandy S., Bowers S., Graves K., Elias A. & Whisnant C. 2003.** The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*. 59: 1799-1810.
- 78 Wiltbank M.C., Carvalho P.D., Keskin A., Hackbart K.S., Meschiatti M.A., Bastos M.R., Guenther J.N., Nascimento A.B., Herlihy M.M., Amundson M.C. & Souza A.H. 2011.** Effect of progesterone concentration during follicle development on subsequent ovulation, fertilization, and early embryo development in lactating dairy cows. *Biology of Reproduction*. **85: 685.**
- 79 Wiltbank J.N., Hawk H.W., Kidder H.E., Black W.G., Ulberg L.C. & Casida L.E. 1956.** Effect of progesterone therapy on embryos survival in cows of lowered fertility. *Journal of Dairy Science*. 39: 456-461.
- 80 Wiltbank M., Lopez H., Sartori R., Sangsritavong S. & Gumen A. 2006.** Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 65: 17-29.