

## A adição de insulina ao diluidor diminui a peroxidação lipídica no sêmen criopreservado de bovinos

Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>3</sup>, Gabriela Marques Rezende<sup>1</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia Oliveros<sup>1</sup>, Manoel Francisco Sá Filho<sup>4</sup>, Neimar Correa Severo<sup>4</sup>, João Pedro Brandão Zandonaide<sup>4</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Pirassununga, São Paulo, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil; <sup>4</sup>Alta Genetics, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

\*e-mail: celeghin@usp.br

Os espermatozoides possuem grandes quantidades de ácidos graxos insaturados em sua membrana e uma pequena quantidade de antioxidantes capazes de debelar a ação das espécies reativas ao oxigênio, resultando na peroxidação lipídica que acarreta em modificações nas estruturas, composição e dinâmica das membranas. A insulina e o IGF-I são hormônios que atuam no metabolismo espermático e foram relatados promoverem a crioproteção das membranas espermáticas em outras espécies. Em adição, a capacidade do sêmen congelar e descongelar bem, é característico de cada animal, assim os reprodutores podem ser classificados como indivíduos de alta e baixa congelabilidade, independente de apresentarem os parâmetros espermáticos dentro do preconizado no sêmen *in natura*. Assim, associando a diferença de congelabilidade e os danos já ocasionados pelo processo de criopreservação do sêmen, foi proposto o uso de insulina e do IGF-I com o objetivo de avaliar o efeito da adição destes em sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade sobre a peroxidação lipídica. Foram utilizados quatro ejaculados de 10 touros de alta (n=40) e de 10 touros de baixa (n=40) congelabilidade da raça Nelore, que foram divididos em três frações iguais, sendo acrescentados os tratamentos: Controle: somente diluidor Triladyl<sup>®</sup>; IGF: diluidor Triladyl<sup>®</sup> + IGF-I (100 ng/mL) e INS: diluidor Triladyl<sup>®</sup> + insulina (150 µUI/mL). Após a criopreservação, o sêmen foi avaliado quanto a peroxidação lipídica com auxílio da sonda fluorescente C11-BODIPY<sup>®</sup> (Molecular Probes Inc Eugene, Oregon, EUA) utilizando o citômetro de fluxo modelo BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) controlado pelo software BD FACSDiva 6.0. Foram considerados os efeitos de tratamento (controle, insulina e IGF) e de grupo (alta e baixa congelabilidade) e os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Não houve interação entre tratamento x congelabilidade para os grupos controle (679,46 ± 25,20 ua), IGF-I (632,40 ± 26,00 ua) e insulina (561,31 ± 23,00 ua). No entanto, houve efeito de grupo (P<0.0001), o grupo que recebeu insulina (558,58 ± 17,41 ua) apresentou menor peroxidação lipídica quando comparado ao controle (687,53 ± 21,28 ua) e ao IGF-I (638,42 ± 19,16 ua). Pode-se concluir com este estudo que a insulina na concentração de 150 µUI/mL adicionada aos diluidores de criopreservação de sêmen foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica e pode ser uma alternativa promissora no processo de criopreservação de sêmen.

**Palavras-chave:** Bovinos, criopreservação de sêmen, IGF-1.

**Agradecimentos:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2018/25938-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 312510/2021-7). À empresa Alta Genetics do Brasil por ceder os animais e espaço para realização da pesquisa.

## The addition of insulin to the extender decreases lipid peroxidation in cryopreserved bovine semen

Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>3</sup>, Gabriela Marques Rezende<sup>1</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia Oliveros<sup>1</sup>, Manoel Francisco Sá Filho<sup>4</sup>, Neimar Correa Severo<sup>4</sup>, João Pedro Brandão Zandonaide<sup>4</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology - Center of Biotechnology in Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>2</sup>Laboratory of Semen Biotechnology and Andrology - Center of Biotechnology in Animal Reproduction - Department of Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>3</sup>Federal University of Paraná, Curitiba, PR; <sup>4</sup>Alta Genetics, Uberaba, MG.

\*e-mail: celeghin@usp.br

Spermatozoa have large amounts of unsaturated fatty acids in their membrane and a small amount of antioxidants capable of quelling the action of reactive oxygen species, resulting in lipid peroxidation that leads to changes in the structures, composition and dynamics of membranes. Insulin and IGF-I are hormones that act on sperm metabolism and have been reported to promote cryoprotection of sperm membranes in other species. In addition, the ability of semen to freeze and thaw well is characteristic of each animal, so that the bulls can be classified as individuals with high and low freezeability, regardless of the sperm parameters presented in *in natura* semen. Thus, associating the difference in freezeability and the damage already caused by the semen cryopreservation process, the use of insulin and IGF-I was proposed with the objective of evaluating the effect of adding these in semen of high and low freezeability bulls on lipid peroxidation. Four ejaculates from 10 bulls of high (n=40) and 10 bulls of low (n=40) freezeability of the Nellore breed were used. Each ejaculate was divided into three equal fractions, and the treatments were added: Control: only extender (Trilady<sup>1</sup>®); IGF-I: extender + IGF-I (100 ng/mL) and INS: extender + insulin (150 µUI/mL). After cryopreservation, the semen was evaluated for lipid peroxidation with the aid of the C11-BODIPY<sup>®</sup> fluorescent probe (Molecular Probes Inc Eugene, Oregon, USA) using the BD FACSAria model flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) controlled by the BD FACSDiva 6.0 software. The effects of treatment (control, IGF-I and insulin) and group (high and low freezeability) were considered. Data were submitted to analysis of variance, followed by Tukey's test, with a significance level of 5%. There was no interaction between treatment x freezeability (P>0.05) for the control (679.46 ± 25.20 ua), IGF-I (632.40 ± 26.00 ua) and insulin (561.31 ± 23.00 ua) groups. There was group effect of high and low freezeability (P<0.0001), the group that received insulin (558.58 ± 17.41 au) had lower lipid peroxidation when compared to the control (687.53 ± 21, 28 ua) and to IGF-I (638.42 ± 19.16 ua). It can be concluded from this study that insulin at a concentration of 150 µUI/mL added to semen cryopreservation extenders was able to decrease lipid peroxidation and may be a promising alternative in the semen cryopreservation process.

**Keywords:** Bovine, cryopreservation, sperm, IGF-I

**Acknowledgments:** To the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP, process 2018/25938-5) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process 312510/2021-7). To the company Alta Genetics of the Brazil for providing the animals and space for carrying out the research.

## A suplementação de zinco ao diluidor de criopreservação melhora a capacidade de ligação dos espermatozoides às células epiteliais da tuba uterina em bovinos

Artur de Albuquerque Rebequi<sup>1</sup>, Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>, Juliana Portela Gonçalves Fagundes<sup>1</sup>, Gabriel de Miranda Teodoro Soares<sup>1</sup>, Alexandre da Rocha Bozzi<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, e Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

\*e-mail: celeghin@usp.br

O zinco extracelular possui função de regulação estrutural do acrossoma e dos eventos da capacitação espermática, bem como há evidências do seu papel na ligação entre o espermatozoide e o oócito. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de zinco ao diluidor de criopreservação sobre a qualidade espermática e capacidade de ligação dos espermatozoides bovinos em células epiteliais da tuba uterina. Para o experimento foram realizadas quatro colheitas de sêmen de cinco touros (n=20) da raça Nelore, com auxílio de um eletroejaculador (Autojac<sup>®</sup>, Neovet, Uberaba, MG, Brasil). Logo após a colheita, o sêmen foi avaliado *in natura* quanto ao volume (mL), concentração (n. spz/mL), motilidade (%), vigor (1-5) e morfologia espermática (%). Após as avaliações o sêmen foi dividido em dois tratamentos: controle (CO): sêmen diluído (80x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) em meio de criopreservação comercial (Optidux<sup>®</sup>, Reprodux, Itapira, SP, Brasil) e com a adição de zinco (ZN): sêmen diluído (80x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) em meio de criopreservação comercial (Optidux<sup>®</sup>, Reprodux, Itapira, SP, Brasil) adicionado de 10 µg/mL de cloreto de zinco. Após 10 minutos de interação entre o sêmen e o diluidor, o sêmen foi envasado em palhetas (0,25 mL) e criopreservado utilizando sistema automatizado e armazenado em botijão criogênico (-196°C). Após a criopreservação, o sêmen foi descongelado (37°C/30 seg) e avaliado quanto às características morfofuncionais: motilidade, vigor, cinética espermática (por sistema computadorizado de análise espermática - CASA), morfologia espermática (pela técnica da câmara úmida em microscopia de contraste de interferência diferencial – DIC, classificado em defeitos maiores e menores) e integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (utilizando sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência). Em adição, foi avaliada a capacidade de ligação espermática às células epiteliais da tuba uterina. Resumidamente, foram cultivadas células da tuba uterina bovina (obtidas em matadouro), para formação de agregados. Os agregados selecionados foram colocados em gotas de meio de cultivo (~30 agregados/gota), adicionando-se sêmen (1x10<sup>6</sup> spz/gota) de cada tratamento, touro e partida, em seguida foram co-cultivados à 38,5°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar por 24 horas. Após, os agregados foram separados, lavados e colocados entre lâmina e lamínula para avaliação sob microscopia óptica (aumento de 400x). Foram tiradas duas fotos de cada agregado, as imagens foram avaliadas por um software (Image J) quanto ao perímetro e ao número e espermatozoides ligados aos agregados. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo procedimento MIXED do Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004) para comparação dos grupos (CO e ZN). O nível de significância considerado foi de 5%. Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (CO x ZN) para a qualidade espermática, no entanto, foi notado que a adição de zinco aumentou (P = 0,01) o número de espermatozoides ligados às células da tuba uterina (CO: 0.21±0.02 e ZN: 0.23±0.01). Estes resultados apontam para a importância do zinco na ligação espermática, podendo ser um aditivo com potencial de melhora na fertilidade. A adição do zinco ao diluidor de criopreservação bovino aumenta a ligação entre os espermatozoides e os agregados de células epiteliais da ampola da tuba uterina, embora, não altere as características de cinética espermática, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, nem as características morfológicas espermáticas em bovinos. Estes resultados trazem luz para a realização de outros estudos com a adição de zinco aos diluidores para incrementar a fertilidade de touros.

**Palavras-chaves:** espermatozoides, tuba uterina, aglomerados, cloreto de zinco, fertilização.

## Zinc supplementation to cryopreservation extender improves sperm binding to oviductal epithelial cells in bovine

Artur de Albuquerque Rebequi<sup>1</sup>, Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>, Juliana Portela Gonçalves Fagundes<sup>1</sup>, Gabriel de Miranda Teodoro Soares<sup>1</sup>, Alexandre da Rocha Bozzi<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, and Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Teaching and Research in Pathology of Reproductive, Department of Animal Reproduction, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Semen Biotechnology and Andrology, Department of Animal Reproduction, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brazil. <sup>3</sup>Laboratory of Andrology and Technology of Swine Embryos, Department of Animal Reproduction, FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brazil.

\*e-mail: celeghin@usp.br

Extracellular zinc plays a role in the structural regulation of the acrosome and sperm capacitation events, as well as, there is evidence of its role in the connection between the sperm and the oocyte. Thus, this study aimed to evaluate the effect of adding zinc to the cryopreservation extender on sperm quality and the binding capacity of bovine spermatozoa in oviductal cells. For the experiment, four ejaculates were collected from five Nelore bulls (n=20) by electroejaculation (Autojac V2, Neovet, Uberaba, Brazil). Right after collection, the *in natura* semen was evaluated for volume (mL), concentration (n. spz/mL), motility (%), vigor (1-5) and sperm morphology (%). After evaluations the semen was divided into two treatments: control (CO): diluted semen ( $80 \times 10^6$  sperm/mL) using cryopreservation commercial medium (Optidux<sup>®</sup>, Reprodux, Itapira, SP, Brazil) and zinc (ZN): diluted semen ( $80 \times 10^6$  spermatozoa/mL) with the same cryopreservation medium containing 10 µg/mL of zinc chloride. After 10 minutes of semen and extender interaction, the semen was packaged in straws (0.25 mL) and cryopreserved using an automated system and stored in a cryogenic cylinder (-196°C). After cryopreservation, the semen was thawed (37°C/30 sec) and evaluated for morphofunctional characteristics: motility, vigor, sperm kinetics (by computerized assisted sperm analysis - CASA), sperm morphology (by the wet chamber technique in differential interference contrast microscopy - DIC, classified into major and minor defects), and integrity of plasma and acrosomal membranes and mitochondrial membrane potential (using fluorescent probes by epifluorescence microscopy). In addition, the sperm capacity to bind to oviductal epithelial cells was evaluated. Briefly, bovine oviductal epithelial cells (obtained at a slaughterhouse) were cultured for aggregate formation. The selected aggregates were placed in drops of culture medium (~30 aggregates/drop), adding semen ( $1 \times 10^6$  sperm/drop) from each treatment, bull and batch, then they were co-cultivated at 38.5°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air for 24 hours. Afterwards, the aggregates were separated, washed and placed between slide and coverslip for evaluation under optical microscopy (400x magnification). Two photos were taken of each aggregate, the images were evaluated by software (Image J) for perimeter and the number of sperm attached to the aggregates. Data were analyzed by variance (ANOVA) using the MIXED procedure of Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 2004) for comparison of groups (CO and ZN). The significance level considered was 5%. No differences were found between treatments (CO x ZN) for sperm quality, however, it was noted that the addition of zinc to the cryopreservation medium increased (P = 0.01) the number of spermatozoa bound to oviductal epithelial cells (CO:  $0.21 \pm 0.02$  and ZN:  $0.23 \pm 0.01$ ). These results point to the importance of zinc in sperm binding, and may be an additive with the potential to improve fertility. The addition of zinc to the bovine cryopreservation extender increases the binding between the spermatozoa and the aggregates of epithelial cells of the uterine tube ampulla, although it does not change the characteristics of sperm kinetics, the integrity of the plasmatic and acrosomal membranes and mitochondrial membrane potential, nor sperm morphological characteristics in cattle. These results shed light on further studies with the addition of zinc to extenders to increase fertility in bulls.

**Keywords:** spermatozoa, oviductal cells, agglomerates/explants, zinc chloride, fertilization

## Adição do óleo essencial da casca de laranja pera na preservação espermática de bovinos

Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante<sup>1\*</sup>, Camilla Flávia de Avelino Farias<sup>2</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CBIotec/UFPB, João Pessoa, PB; <sup>2</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), UFPB, João Pessoa, PB; <sup>3</sup>Departamento de Biotecnologia, CBIotec/UFPB, João Pessoa/PB.

\*e-mail: chrisbrilhante@gmail.com

No Brasil, a laranja pera é um produto de impacto econômico, com extenso uso na indústria alimentícia, entretanto, com consequente geração de resíduos como a casca da fruta. Devido à importância ambiental do aproveitamento da casca de laranja e tendo em vista o potencial antioxidante e antimicrobiano dos seus extratos, este trabalho objetivou avaliar o uso do óleo essencial da casca de laranja na composição de um diluidor para conservação espermática de bovinos. Para este fim, cascas de laranja foram trituradas em liquidificador junto a água destilada (1:3) e submetidas ao método de hidrodestilação (Clevenger) para obtenção do óleo essencial de casca de laranja (OE). Após extração do OE, foi realizada a caracterização e formação dos grupos experimentais: 1) Grupo Controle (GC): diluidor tris-gema, sem adição do OE; 2) Grupo T1: tris-gema acrescido de 1% do OE; 3) Grupo T2: tris-gema acrescido de 1,25% do OE; 4) Grupo T3: tris-gema acrescido de 1,5% do OE; 5) Grupo T4: tris-gema acrescido de 1,75% do OE e 5) Grupo T5: tris-gema acrescido de 2% do OE. Espermatozoides epididimários foram obtidos pela técnica de flutuação, distribuídos nos grupos (20 x 10<sup>6</sup> spz/mL), submetidos à curva de refrigeração, estabilização de quatro horas e subsequente curva de congelamento. Após descongelamento, foram realizados os testes de motilidade total subjetiva (média de duas avaliadoras), integridade (teste de dupla coloração: eosina-nigrosina) e funcionalidade da membrana plasmática (teste hipoosmótico). Em relação à motilidade, percebeu-se redução inversamente proporcional ao aumento da concentração de OE, sendo de 31,5±5,2% no GC, 7,5±3,7% (p<0,05) no grupo com 1% de OE e 0,0±0,0% (p<0,05) no grupo com 2% de OE. Para a integridade da membrana, não houve diferença entre o GC (31,5±9,9) e os grupos que receberam até 1,5% do OE (28,0±9,3; 29,5±9,9 e 19,5±6,3, respectivamente), reduzindo a preservação da membrana plasmática (p<0,05) a partir da concentração de 1,75% do OE (10,5±0,5; 12,5±0,5). Na funcionalidade da membrana plasmática, entretanto, a redução (p<0,05) ocorreu desde a menor concentração do OE, sendo esta redução gradativa até a maior concentração. Na composição do OE, foi verificada a presença de monoterpenos, majoritariamente o limoneno, assim como atividade antioxidante, pela presença de flavonoides. Esperava-se que estes componentes pudessem melhorar a viabilidade da célula espermática submetida ao processo de criopreservação, porém a adição do OE ao diluidor evidenciou efeito negativo nos parâmetros essenciais ao espermatozoide, tornando-se tóxica a interação do OE com a célula. Baseado no exposto, a adição do óleo essencial de casca de laranja, nas concentrações de 1 a 2%, ao diluidor de congelamento de espermatozoides bovinos não apresenta efeito crioprotetor e pode ser deletéria à célula espermática bovina.

**Palavras-chave:** biotecnologia; criopreservação; espermatozoide; limoneno.

## Addition of pear orange peel essential oil to bovine sperm preservation

Christianne Emmanuelle Andrade Pires Brilhante<sup>1\*</sup>, Camilla Flávia de Avelino Farias<sup>2</sup>, Sildivane Valcácia Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, CBIotec/UFPPB, João Pessoa, PB; <sup>2</sup>Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), UFPPB, João Pessoa, PB; <sup>3</sup>Departamento de Biotecnologia, CBIotec/UFPPB, João Pessoa/PB.

\*e-mail: chrisbrilhante@gmail.com

In Brazil, the pear orange is a product of economic impact, with extensive use in the food industry, however, with consequent generation of waste such as the fruit peel. Due to the environmental importance of reusing orange peel and considering the antioxidant and antimicrobial potential of its extracts, this work aimed to evaluate the use of orange peel essential oil in the composition of a bovine sperm conservation extender. For this purpose, orange peels were crushed in a blender with distilled water (1:3) and submitted to the hydrodistillation method (Clevenger) to obtain orange peel essential oil (EO). After extracting the EO, the characterization and formation of the experimental groups was performed: 1) Control group (CG): tris-yolk egg extender, without EO; 2) T1 group: tris-yolk egg plus EO 1%; 3) T2 group: tris-yolk egg plus EO 1,25%; 4) T3 group: tris-yolk egg plus EO 1,5%; 5) T4 group: tris-yolk egg plus EO 1,75%, and, 5) T5 group: tris-yolk egg plus EO 2%. Epididymal spermatozoa were obtained by the flotation technique, distributed in groups ( $20 \times 10^6$  spz/mL), submitted to cooling curve, four hours to equilibration time and subsequent freezing curve. After thawing, subjective total motility tests (average of two evaluators), integrity (double staining test: eosin-nigrosin) and plasma membrane functionality (hyposmotic test) were performed. Regarding motility, a reduction was inversely proportional to the increase in EO concentration, being  $31.5 \pm 5.2\%$  in the CG,  $7.5 \pm 3.7\%$  ( $p < 0.05$ ) in the group with 1% EO and  $0.0 \pm 0.0\%$  ( $p < 0.05$ ) in the group with 2% EO. For membrane integrity, no difference was observed between the CG ( $31.5 \pm 9.9$ ) and the groups that received up to EO 1.5% ( $28.0 \pm 9.3$ ;  $29.5 \pm 9.9$  and  $19.5 \pm 6.3$ , respectively), reducing the preservation of the plasmatic membrane ( $p < 0.05$ ) from the concentration of EO 1.75% ( $10.5 \pm 0.5$ ;  $12.5 \pm 0.5$ ). To Plasma membrane functionality, however, the reduction ( $p < 0.05$ ) occurred from the lowest concentration of EO, with this reduction being gradual up to the highest concentration. In the composition of the EO, was verified the presence of monoterpenes, mainly limonene, as well as antioxidant activity, due to flavonoids presence. It was expected that these components could improve the viability of the sperm cell submitted to the cryopreservation process, but the EO addition in extender to sperm preservation had a negative effect on sperm parameters, with the interaction of EO with the cell being toxic. Based on the exposed data, the addition of orange peel essential oil, at concentrations of 1 to 2%, to bovine spermatozoa freezing extender does not have a cryoprotective effect and may be deleterious to bovine sperm cells.

**Keywords:** biotechnology; criopreservation; limonene; spermatozoon.



## Associação do perímetro escrotal de touros Nelore em idade reprodutiva com a DEP genômica para perímetro escrotal aos 365 e aos 450 dias

Mariana Fernandes Souza<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>1</sup>, Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>1</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup>Professor no curso de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil

\*e-mail: marianafernandes@ufba.br

A perímetro escrotal (PE) tem sido apresentado em diversos estudos como uma importante característica para avaliar a capacidade reprodutiva dos touros, devido a sua correlação positiva com parâmetro de concentração, motilidade e morfologia espermática. Além disso, é uma característica de moderada a alta herdabilidade e repetitividade, sendo amplamente utilizada na atualidade como fator de seleção de reprodutores. Outro parâmetro que vem ganhando destaque no mercado da pecuária são os valores e índices da diferença esperada na progênie (DEP) e o seu incremento com a avaliação genômica, gerando a DEPG. Esta é uma ferramenta que permite a avaliação de reprodutores a partir da estimativa da diferença média esperada de sua progênie em relação à média de uma população. A DEPG para o perímetro escrotal aos 365 dias (PE365G) e aos 450 dias (PE450G), representam uma estimativa do PE da progênie de determinado touro ao completar um ano de idade e ao sobreano, sendo uma importante característica associada a precocidade sexual e fertilidade. Objetivou-se com o presente estudo avaliar a correlação do PE com valores de DEPG para PE365 e PE450 de touros nelores em idade reprodutiva. Para isso foram utilizados dados de exames andrológicos, realizados em fase de pré-comercialização, de 72 touros genotipados com idades entre 21 e 25 meses, localizados em uma propriedade na região do triângulo mineiro e do alto Paranaíba do estado de Minas Gerais. Os valores de PE foram obtidos por meio de avaliação com fita métrica apropriada, graduada em milímetros, posicionada na região de maior perímetro do saco escrotal, conforme orientação do CBRA (2013). Os dados genômicos de PE365 e PE450 foram coletados a partir de dados públicos do Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos - PMGZ. Os dados obtidos foram submetidos a teste estatísticos de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, sendo os dados não paramétricos correlacionados pelo teste de Spearman. Foi observada uma média de  $38,7 \pm 2,43$  cm para a característica de PE,  $0,923 \pm 0,470$  cm para o PE365 e uma média de  $1,38 \pm 0,588$  cm para o PE450. Foi observada uma correlação significativa entre PE e PE365 ( $p < 0,05$ ) com  $r = 0,274$  e entre PE e PE450 ( $p < 0,05$ )  $r = 0,268$ . Esses achados corroboram com o que é apresentado na literatura, que descrevem o PE como uma característica de moderada e a alta herdabilidade. O motivo do valor da correlação ( $r$ ) ter se apresentado fraco pode estar relacionado ao fato dos animais utilizados nesse estudo apresentarem apenas a DEPG por avaliação genética, não possuindo ainda descendentes avaliados, o que torna baixa a acurácia dos dados genômicos utilizados. Desta forma, conclui-se que é possível prever uma estimativa do PE365 e PE450 a partir de dados de PE de touros em idade reprodutiva.

**Palavras-chave:** Eficiência reprodutiva, Nelore, Circunferência escrotal.

## Association of scrotal perimeter of Nellore bulls in reproductive age with genomic DEP for scrotal perimeter at 365 and 450 days

Mariana Fernandes Souza<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>1</sup>, Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>1</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos, UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup>Professor no curso de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil

\*e-mail: marianafernandes@ufba.br

The scrotal circumference (SC) has been presented in several studies as an important characteristic to evaluate the reproductive capacity of bulls, due to its positive correlation with concentration parameter, motility, and sperm morphology. In addition, it is a characteristic of moderate to high heritability and repeatability and is currently widely used as a factor in the selection of breeding stock. Another parameter that has been gaining prominence in the livestock market are the values and indices of the expected difference in the progeny (EPD) and their increment with the genomic evaluation, generating the EDPG. This is a tool that allows the evaluation of sires based on the estimation of the expected mean difference of their progeny in relation to the mean of a population. The EDPG for the scrotal perimeter at 365 days (SC365G) and at 450 days (SC450G) represent an estimate of the SC of the progeny of a given bull at the age of one year and at yearling, being an important characteristic associated with sexual precocity and fertility. The aim of the present study was to evaluate the correlation of SC with EDPG values for SC365 and SC450 of Nellore bulls at reproductive age. For this purpose, data from andrological examinations, carried out in the pre-marketing phase, of 72 genotyped bulls aged between 21 and 25 months, located on a property in the region of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba in the state of Minas Gerais, were used. SC values were obtained by means of an evaluation with an appropriate measuring tape, graduated in millimeters, positioned in the region with the greatest perimeter of the scrotum, as per the guidelines of the CBRA (2013). SCE365 and SC450 genomic data were collected from public data from the Zebu Genetic Improvement Program - PMGZ. The data obtained were subjected to statistical normality tests using the Shapiro-Wilk method, with non-parametric data correlated using the Spearman test. An average of  $38.7 \pm 2.43$  cm was observed for the SC characteristic,  $0.923 \pm 0.470$  cm for the SC365 and an average of  $1.38 \pm 0.588$  cm for the SC450. A significant correlation was observed between PE and PE365 ( $p < 0.05$ ) with  $r = 0.274$  and between SC and SC450 ( $p < 0.05$ )  $r = 0.268$ . These findings corroborate what is presented in the literature, which describe SC as a characteristic of moderate and high heritability. The reason for the weak correlation value ( $r$ ) may be related to the fact that the animals used in this study only presented EDPG by genetic evaluation, not yet having evaluated descendants, which makes the accuracy of the genomic data used low. Thus, it is concluded that it is possible to predict an estimate of SC365 and SC450 from SC data of bulls at reproductive age.

**Keywords:** Reproductive efficiency, Nellore, Scrotal circumference



## Associação entre o perímetro escrotal e a DEP genômica para acabamento de carcaça em touros Nelores

**Gabriel Santos Palma<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Maíra Planzo Fernandes<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia – HospMev/UFBA; <sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>3</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA.

\*e-mail: gabriel.palma@ufba.br

A diferença esperada da progênie (DEP) para acabamento de gordura (ACAB) compõe o quadro de parâmetros usualmente utilizados na seleção de reprodutores melhoradores de rebanho. É uma característica baseada em uma avaliação de espessura de gordura subcutânea realizada por meio de exame ultrassonográfico no animal vivo e expressa em milímetros. Esse parâmetro está relacionado não só com a precocidade no acabamento de carcaça do touro, como também com a precocidade sexual. A espessura de gordura é um dos principais parâmetros de qualidade exigidos pela indústria frigorífica, pois é uma característica essencial para proteger a carcaça de encurtamento pelo frio, perda de umidade e escurecimento indesejado da carne durante a etapa de resfriamento. Com a introdução comercial dos marcadores moleculares para avaliação de DNA, tornou-se possível estimar a diferença esperada da progênie para acabamento de gordura genômica (ACABG) da progênie de touros que ainda não entraram na atividade reprodutiva ou ainda permitindo aumentar a acurácia dos dados de touros já provados. No exame andrológico de bovinos, o perímetro escrotal (PE) está entre as principais características a serem avaliadas, devido a facilidade de mensuração e a repetibilidade dos resultados, além do fato do PE ser uma medida amplamente utilizada nos programas de melhoramento de bovinos. Com este resumo, objetivou-se apresentar a associação do PE de touros Nelores em idade reprodutiva, destinados à comercialização como reprodutores e a sua correlação com a ACABG. Para isso foram utilizados dados de exames andrológicos, realizados em fase de pré-comercialização, de 72 touros genotipados com idades entre 21 e 25 meses, localizados em uma propriedade na região do Triângulo Mineiro e do Alto Paranaíba do estado de Minas Gerais. Os valores de PE foram obtidos por meio de avaliação com fita métrica apropriada, graduada em milímetros, posicionada na região de maior perímetro do saco escrotal, conforme orientação do CBRA (2013). Os dados de ACABG foram coletados a partir de dados públicos do Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos - PMGZ. Os dados obtidos foram submetidos a teste estatísticos de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, sendo os dados não paramétricos correlacionados pelo teste de Spearman. Foi observada uma média de  $38,7 \pm 2,43$  cm para a característica de PE e uma média de  $1,82 \pm 1,54$  para ACABG. Foi encontrada uma correlação significativa entre o PE e o ACABG ( $p < 0,01$ ) com valor de  $r = 0,423$ , sendo considerada uma correlação moderada. Esse resultado corrobora com os achados da literatura que citam correlação positiva entre o PE com o crescimento, peso e acabamento da carcaça. Pode-se concluir que, nas condições presentes neste estudo, a mensuração do PE é capaz de predizer estimativas da DEPG para acabamento de carcaça em bovinos da raça nelore.

**Palavras-chave:** DEP genômica, acabamento de gordura, Circunferência Escrotal.

## Association between scrotal perimeter and genomic DEP for carcass finishing in Nellore bulls

**Gabriel Santos Palma<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Maíra Planzo Fernandes<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup>Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia – HospMev/UFBA; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>3</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA.

\*e-mail:gabriel.palma@ufba.br

The expected progeny difference (EPD) for fat finish (ACAB) composes the parameters usually used in the selection of herd-improving sires. It is a characteristic based on an assessment of subcutaneous fat thickness performed by means of an ultrasound examination in a live animal and expressed in millimeters. This parameter is related not only to the precocity in the finishing of the bull's carcass, but also to sexual precocity. Fat thickness is one of the main quality parameters required by the slaughterhouse industry, as it is an essential characteristic to protect the carcass from cold shortening, moisture loss and unwanted browning of the meat during the cooling step. With the commercial introduction of molecular markers for DNA evaluation, it became possible to estimate the expected progeny difference for genomic fat finish (ACABG) of the progeny of bulls that have not yet entered breeding activity or even allowing to increase the accuracy of data from already proven bulls. In the andrological examination of bovines, the scrotal perimeter (SP) is among the main characteristics to be evaluated, due to the ease of measurement and the repeatability of the results, in addition to the fact that the SP is a widely used measure in bovine breeding programs. With this summary, the objective was to present the association of the SP of Nellore bulls in reproductive age, destined to the commercialization as sires and its correlation with the ACABG. For this purpose, data from andrological examinations, carried out in the pre-marketing phase, of 72 genotyped bulls aged between 21 and 25 months, located on a property in the region of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba in the state of Minas Gerais, were used. SP values were obtained by means of an evaluation with an appropriate measuring tape, graduated in millimeters, positioned in the region with the greatest perimeter of the scrotum, as per the guidelines of the CBRA (2013). ACABG data were collected from public data from the Zebu Genetic Improvement Program - PMGZ. The data obtained were subjected to statistical normality tests using the Shapiro-Wilk method, with non-parametric data correlated using the Spearman test. An average of  $38.7 \pm 2.43$  cm was observed for the SP characteristic and an average of  $1.82 \pm 1.54$  for ACABG. A significant correlation was found between PE and ACABG ( $p < 0.01$ ) with a value of  $r = 0.423$ , being considered a moderate correlation. This result corroborates the findings in the literature that mention a positive correlation between SP and carcass growth, weight and finishing. It can be concluded that, under the conditions present in this study, the measurement of SP is capable of predicting genomic EPD estimates for carcass finishing in Nellore cattle.

**Keywords:** Genomic EPD, fat trimming, Scrotal Circumference.

## Avaliação da susceptibilidade a diferentes desafios oxidativos em sêmen criopreservado de touros de alta e baixa fertilidade

Raphaella Gabrielle Brito Sousa<sup>1\*</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Mônica Degraf Cavallin<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Gabriel Augusto Novaes<sup>1</sup>, Julia de Lima Simões<sup>1</sup>, Thais Rose Santos Hamilton<sup>1</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção<sup>1</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP;

<sup>2</sup>University of Florida (UFL)

\*e-mail: rgbsousa@usp.br

A fertilidade é a característica mais importante a ser considerada no manejo reprodutivo de bovinos. A este respeito, sabe-se que o efeito individual do touro é de extrema importância, pois um touro pode fertilizar um grande número de fêmeas. Tal efeito pode ser ainda mais pronunciado quando se utiliza sêmen criopreservado que permite conservar e transmitir ao rebanho o material genético de touros superiores; no entanto, lotes subfêrteis podem levar a perdas significativas. Um fator importante que pode levar ao comprometimento da fertilidade é o estresse oxidativo (EO). Visando evitar esse efeito, uma terapia antioxidante pode ser uma alternativa. No entanto, escolher o antioxidante certo é a chave para uma terapia bem-sucedida. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de espermatozoides de touros com diferentes taxas de fertilidade frente a diferentes desafios oxidativos visando detectar os mais deletérios. Para tanto, foram utilizadas 20 amostras de sêmen de touros de alta fertilidade (HF) (n=10) e de baixa fertilidade (LF) (n=10) da raça Angus, todas as palhetas foram submetidas ao mesmo protocolo de congelamento, provenientes da mesma central. Foram descongelados e submetidos a desafios oxidativos induzidos (usando o sistema xantina-xantina oxidase para produzir ânion superóxido [O<sub>2</sub><sup>-</sup>], alíquotas de peróxido de hidrogênio [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] 4mM, foram adicionados para a produção de radical hidroxila [OH<sup>-</sup>] e incubadas com sulfato ferroso e ácido ascórbico e o subproduto tóxico da peroxidação lipídica ou malondialdeído [MDA] adicionado a uma concentração de 4 mM, e também havia um grupo controle onde PBS foi adicionado à amostra. A fertilidade foi determinada usando um índice baseado em 170.000 inseminações artificiais em 543 fazendas. Amostras foram avaliadas para a quantificação do subproduto da peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS), cinética espermática (CASA), atividade mitocondrial (3'3 diamenobenzidina) e por meio de citometria de fluxo no qual foram avaliadas no estado oxidativo (CellROX green e diacetato de diclorofluoresceína 2'-7'), potencial mitocondrial (JC-1), integridade do DNA (LA). Avaliado também a susceptibilidade à peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS) e em microscopia simples avaliamos a integridade membrana plasmática (eosina/nigrosina) e integridade acrossômica (fast green/rosa bengala). A análise estatística foi realizada por meio do sistema SAS, com valor de significância (p) inferior a 0,05. Independentemente da fertilidade, a indução com hidroxila reduziu a atividade mitocondrial, enquanto a incubação com peróxido aumentou a atividade mitocondrial (HF DAB I 37.40 ± 4.71<sup>b</sup> / LF DAB I 44.50±2.78<sup>b</sup> e HF DAB IV 48.86 ± 1.49<sup>a</sup> / LF DAB IV 43.44±3.68<sup>a</sup>), o radical hidroxila foi o único que diferiu dos demais grupos. No entanto, o grupo peróxido foi altamente deletério à cinética espermática (HF MOTILIDADE 0.80±0.29<sup>b</sup> / LF MOTILIDADE 0.90±0.38<sup>c</sup>). O grupo de baixa fertilidade apresentou maior peroxidação nas amostras incubadas com peróxido de hidrogênio, enquanto o grupo de alta fertilidade foi mais suscetível à hidroxila, sendo o radical hidroxila potencialmente o mais nocivo aos compostos biológicos (HF TBARS 32,22 ± 3,49<sup>a</sup> / LF TBARS 29,42 ± 3,91<sup>c</sup>). Em conclusão, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>-</sup> parecem ser as espécies reativas de oxigênio mais deletérias para o espermatozoide bovino com *status* oxidativo do grupo de baixa fertilidade altamente afetado pelo peróxido de hidrogênio.

**Palavras-chave:** estresse, peroxidação, espermatozoide, EO antioxidante.

## Evaluation of susceptibility to different oxidative challenges in cryopreserved sperm of high and low fertility bulls

Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1\*</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Mônica Degraf Cavallin<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Gabriel Augusto Novaes<sup>1</sup>, Julia de Lima Simões<sup>1</sup>, Thais Rose Santos Hamilton<sup>1</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção<sup>1</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

<sup>2</sup>University of Florida (UFL)

\*e-mail: rgbsousa@usp.br

Fertility is the most important trait to consider in cattle reproductive management. In this regard, individual effect of bull is known to be of utmost importance as a bull can fertilize large numbers of females. Such effect can be even more pronounced when using cryopreserved semen which allows the genetic material of superior bulls to be conserved and transmitted to the herd; however, sub fertile batches may lead to significant losses. An important factor that may lead to impaired fertility is oxidative stress (EO). Aiming to avoid this effect, an antioxidant therapy may be an alternative. However, choosing the right antioxidant is key to a successful therapy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the susceptibility of bull spermatozoa with different fertility rates to different oxidative challenges aiming to detect the most deleterious. Toward this aim, 20 semen samples of highly fertile (HF) bulls (n=10) and low fertile (LF) bulls (n=10) of the Angus breed, all straws submitted to the same freezing protocol, coming from the same central. Were thawed and submitted to induced oxidative challenges (using the xanthine-xanthine oxidase system to produce superoxide anion [O<sub>2</sub><sup>-</sup>], hydrogen peroxide [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] 4mM aliquots, were added for the production of hydroxyl radical [OH<sup>•</sup>] incubated with ferrous sulfate and ascorbic acid and the toxic by-product of lipid peroxidation or malondialdehyde [MDA] added at a concentration of 4mM, and there was also a control group where PBS was added to the sample. Fertility was determined using an index based on 170,000 artificial inseminations in 543 farms. Samples were assessed for the quantification of the by-product of lipid peroxidation (thiobarbituric acid reative substances/TBARS), sperm kinetics (CASA), mitochondrial activity (3'3 diamenobenzidine), and through flow cytometry, four were evaluated at oxidative status (CellROX green and 2'-7' dichlorofluorescein diacetate), mitochondrial potential (JC-1), DNA integrity (LA). Evaluate susceptibility to lipid peroxidation (Thiobarbituric Acid Reactive Substances/TBARS) and simple microscopy evaluated plasma membrane integrity(eosin/nigrosin) and acrosome integrity (fast green/rose bengal). Statistical analysis was performed using the SAS system for windows, with a significant value (p) less than 0.05. Regardless of fertility, hydroxyl induction reduced mitochondrial activity, whereas peroxide incubation increased mitochondrial activity (HF DAB I 37.40 ± 4.71<sup>b</sup> / LF DAB I 44.50±2.78<sup>b</sup> and HF DAB IV 48.86 ± 1.49<sup>a</sup> / LF DAB IV 43.44±3.68<sup>a</sup>), the hydroxyl radical was the only one that differed from the other groups. However, the peroxide group was highly deleterious to sperm kinetics (HF MOTILITY 0.80±0.29<sup>b</sup> / LF MOTILITY 0.90±0.38<sup>c</sup>). The low fertility group presented increased peroxidation in samples incubated with hydrogen peroxide whereas the high fertility group was more susceptible to hydroxyl, the hydroxyl radical is potentially the most harmful to biological compounds (HF TBARS 32.22 ± 3.49<sup>a</sup> / LF TBARS 29.42 ± 3.91<sup>c</sup>). In conclusion, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>•</sup> appears to be the most deleterious ROS to bovine sperm with the oxidative status of the low fertility group highly affected by the hydrogen peroxide.

Keywords: stress, peroxidation, ROS, semen, antioxidant.

## Correlação entre a idade de produção de sêmen e o perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore

Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>1</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>1</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos, UFBA, Salvador, BA.

<sup>3</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA, Salvador, BA.

\*e-mail: luizfernandoq6@gmail.com

Técnicas e estudos de melhoramento genético se tornam cada vez mais difundidos dentro da pecuária e projeta avanços ainda maiores para o futuro. Características que elevem a produtividade animal, a precocidade de novilhas e novilhos e o desempenho geral dos rebanhos, que por consequência aumentem a lucratividade dos sistemas de produção, são os maiores alvos de estudos. O perímetro escrotal, amplamente utilizado na avaliação e seleção de reprodutores, é um parâmetro já conhecido e estudado pela sua herdabilidade na prole, transmitindo características de fertilidade, desenvolvimento reprodutivo e características gerais de produção. Estudos científicos buscam correlacionar cada vez mais o melhor desenvolvimento testicular com características melhoradoras de produção e com sua capacidade de transmissão para os descendentes, a fim de tornar o processo de seleção mais prático e preciso. A puberdade é caracterizada como o início da atividade reprodutiva do animal, sendo seu ponto de partida a produção de um ejaculado com pelo menos  $50 \times 10^6$  de espermatozoides e com pelo menos 10% de motilidade progressiva. Animais zebuínos tendem a ser mais tardios para entrar na fase de puberdade quando comparados a animais de origem europeia, onde a literatura reporta para esta característica uma variação entre 7 a 20 meses de idade. Este trabalho possui como objetivo verificar a existência e o grau de correlação entre as medidas de perímetro escrotal (PE) com a idade de produção de sêmen em touros da raça Nelore. Foram utilizados dados de 72 touros da raça Nelore, submetidos a exame andrológico em critério de pré-comercialização, com idades entre 21 e 25 meses. Os animais residiam em uma propriedade na região do triângulo mineiro e do alto Parnaíba do estado de Minas Gerais. Os valores de PE foram mensurados com o auxílio de fita métrica graduada em milímetros destinada a este fim. A idade de produção de sêmen foi obtida em catálogos públicos de comercialização dos animais e mensurada por programas de melhoramento genético. Todos os dados foram tabulados e submetidos a teste estatístico de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, sendo os dados não paramétricos correlacionados pelo teste de Spearman. A partir dos resultados encontrou-se uma média de  $38,7 \pm 2,43$  cm para as medidas de PE. A idade de produção de sêmen variou de 9 a 22 meses, com uma média de  $15,1 \pm 2,85$  meses. Os dados obtidos por este estudo não apontaram correlação significativa entre as medidas de PE e a produção de sêmen ( $p > 0,05$ ). Esta falta de correlações pode estar relacionada a idade de avaliação dos parâmetros de PE aqui considerados, já que os animais se encontravam em fase pós-puberdade e de crescimento gonadal tendendo a estabilização. Conclui-se desta forma que, a avaliação do PE de bovinos da raça nelore na faixa etária apresentada nesse estudo, não fornece parâmetros suficientes para se estabelecer uma correlação com a idade de produção de sêmen.

**Palavras-chave:** Biometria testicular; Precocidade; Produção Seminal.

## Correlation Between Semen Production Age and Scrotal Perimeter in Nellore Cattle

Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>1</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>1</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos, UFBA, Salvador, BA.

<sup>3</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA, Salvador, BA.

\*e-mail: luizfernandoq6@gmail.com

Techniques and studies of genetic improvement become increasingly widespread within livestock and project even greater advances for the future. Characteristics that increase animal productivity, the precocity of heifers and steers and the general performance of herds, which consequently increase the profitability of production systems, are the main targets of studies. Scrotal perimeter, widely used in the evaluation and selection of breeders, is a parameter already known and studied for its heritability in the offspring, transmitting fertility characteristics, reproductive development and general production characteristics. Scientific studies increasingly seek to correlate the best testicular development with characteristics that improve production and with its ability to be transmitted to descendants, in order to make the selection process more practical and accurate. Puberty is characterized as the beginning of the animal's reproductive activity, its starting point being the production of an ejaculate with at least  $50 \times 10^6$  of spermatozoa and with at least 10% of progressive motility. Zebu animals tend to be later to enter the puberty phase when compared to animals of European origin, where the literature reports for this characteristic a variation between 7 and 20 months of age. This work aims to verify the existence and degree of correlation between scrotal circumference (SP) measurements and semen production age in Nellore bulls. Data from 72 Nellore bulls were used, submitted to andrological examination in pre-marketing criteria, aged between 21 and 25 months. The animals resided on a property in the Minas Gerais Triangle and Alto Parnaíba region in the state of Minas Gerais. PE values were measured with the aid of a measuring tape graduated in millimeters intended for this purpose. The semen production age was obtained from public catalogues for the marketing of animals and measured by genetic improvement programs. All data were tabulated and submitted to a statistical test of normality using the Shapiro-Wilk method, with non-parametric data correlated using the Spearman test. Based on the results, an average of  $38.7 \pm 2.43$  cm was found for the PE measurements. The age of semen production ranged from 9 to 22 months, with an average of  $15.1 \pm 2.85$  months. The data obtained by this study showed no significant correlation between SP measurements and semen production ( $p > 0.05$ ). This lack of correlations may be related to the age of evaluation of the SP parameters considered here, since the animals were in the post-puberty phase and gonadal growth tending towards stabilization. It is thus concluded that the evaluation of the SP of Nellore cattle in the age group presented in this study does not provide sufficient parameters to establish a correlation with the age of semen production.

**Keywords:** Testicular biometry; precocity; seminal production.



## Crescimento do perímetro escrotal e concentração espermática em touros jovens da raça Holandesa criados em condições de semiárido.

Sebastião I. Guido<sup>1\*</sup>, Leonardo Fernandes de Alencar<sup>2</sup>, Venézio Felipe dos Santos<sup>3</sup>, Cláudio Coutinho Bartolomeu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador em reprodução animal, Instituto Agronômico de Pernambuco –IPA, Estação Experimental de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Assistente de pesquisa, Instituto Agronômico de Pernambuco –IPA, Estação Experimental de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup>Pesquisador em estatística aplicada, Instituto Agronômico de Pernambuco –IPA, Sede Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Professor Associado, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Departamento de Medicina Veterinária

\*e-mail: sebastiao.guid@ipa.br

O desempenho reprodutivo depende da adaptabilidade dos animais às condições climáticas. Bovinos da raça Holandesa são de distribuição cosmopolita; todavia, sua eficiência reprodutiva pode ser impactada pelo ambiente ao qual estão submetidos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento do perímetro escrotal (PE) e a concentração espermática em touros jovens (n=102) da raça Holandesa criados no semiárido brasileiro. O trabalho foi desenvolvido na Estação Experimental de São Bento do Una, pertencente ao IPA, localizada no município de São Bento do Una, região Agreste Central de Pernambuco, coordenadas GPS 83° 16' 18" de latitude Sul e 36° 27' 59" de longitude, altitude 625 m e ITU médio de 69,21 de acordo com Buffington et al. (1981). Foram avaliados 102 machos com idade entre 12 e 24 meses por um período de 12 meses. Os animais foram mantidos em sistema de semiconfinamento em sistema *Loose Housing*, recebendo uma dieta composta por silagem de sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*) na proporção de 3% MS/100 kg de peso/animal, concentrado proteicos com 18% PB na proporção de 1 kg/100 kg de peso/animal, além de suplemento mineral e a água *ad libitum*, sendo peso corporal acompanhado aos 12, 18 e 24 meses de idade. A partir dos 12 meses de idade os animais que não apresentavam quaisquer alterações foram submetidos mensalmente a mensuração do PE com fita métrica no terço médio dos testículos e submetidos a coleta de sêmen pelo método de vagina artificial, sendo a concentração espermática avaliada imediatamente por fotômetro (Accuread, IMV). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e análise de regressão e teste F a 5%. Quanto ao peso corporal médio, os animais apresentaram 370 kg, 525 kg e 790 kg aos 12, 18 e 24 meses de idade, respectivamente. Em relação ao PE foram registrados valores médios de 31,40±0,27 cm, 38,40±0,11 cm e 42,24±0,11 cm aos 12, 18 e 24 meses (p<0,05), os quais culminaram com taxa de crescimento diária de 2,53% e de 30,36% no período. As concentrações espermáticas médias foram de 324 x 10<sup>6</sup>, 727 x 10<sup>6</sup> e 1056 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL (p<0,05) aos 12, 18 e 24 meses, respectivamente. A taxa de crescimento foi de 18,08% ao dia e 216,97% nos 12 meses. Portanto, conclui-se que touros jovens da raça Holandesa criados no semiárido apresentam curva de crescimento do perímetro escrotal e concentração espermática compatíveis com estimativa de fertilidade desejável.

**Palavras-chave:** bovino, fertilidade, Holandês.

**Agradecimentos:** FACEPE (APQ 1371-5.05/21).

## Scrotal perimeter growth and sperm concentration in young Holstein bulls raised in semi-arid conditions

Sebastião I. Guido<sup>1\*</sup>, Leonardo Fernandes de Alencar<sup>2</sup>, Venézio Felipe dos Santos<sup>3</sup>, Cláudio Coutinho Bartolomeu<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador em reprodução animal, Instituto Agronômico de Pernambuco –IPA, Estação Experimental de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Assistente de pesquisa, Instituto Agronômico de Pernambuco –IPA, Estação Experimental de São Bento do Una, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup>Pesquisador em estatística aplicada, Instituto Agronômico de Pernambuco –IPA, Sede Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Professor Associado, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Departamento de Medicina Veterinária  
\*e-mail: sebastiao.guid@ipa.br

Reproductive performance depends on the adaptability of animals to climatic conditions. Holstein cattle have a cosmopolitan distribution, but their reproductive efficiency can be impacted by the environment to which they are subjected. In this context, this work aimed to evaluate the growth of scrotal perimeter (SP) and sperm concentration in young Holstein bulls (n=102) raised in the Brazilian semi-arid region. The work was carried out at the Experimental Unit of São Bento do Una, belonging to the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), located in the municipality of São Bento do Una, in the region Agreste Central of Pernambuco, GPS coordinates 83° 16' 18" South latitude and 36° 27' 59" longitude, altitude 625 m and mean THI of 69.21 according to Buffington et al. (1981). A total of 102 males aged between 12 and 24 months were evaluated for a period of 12 months. Kept in a semi-confinement in Loose Housing system, receiving a diet composed of forage sorghum silage (*Sorghum bicolor*) in the proportion of 3% DM/100 kg of weight/animal, protein concentrates with 18% CP in the portion of 1kg/100Kg of weight/animal, in addition to mineral supplement and water *ad libitum*. From 12 months of age, the animals that did not show any pathology were submitted monthly to the measurement of the scrotal perimeter with a measuring tape in the middle third of the testicles and semen were collected by artificial vagina, with the sperm concentration being evaluated through a photometer (Accuraed, IMV) immediately after collection. Data were analyzed by ANOVA, regression analysis and F test at 5% probability. As for the average weight, the animals presented 370 kg, 525 kg and 790 kg at 12, 18 and 24 months of age, respectively. Regarding SP, mean values of 31.40±0.27 cm, 38.40±0.11 cm and 42.24±0.11 cm were recorded at 12, 18 and 24 months (p<0.05) and daily growth rate of 2.53% and 30.36% in the studied period. Mean sperm concentrations were 324 x 10<sup>6</sup>, 727 x 10<sup>6</sup> and 1056 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL (p<0.05) at 12, 18 and 24 months, respectively. Having a a growth rate of 18.08% per day and 216.97% at 12 months. Therefore, it is concluded that young Holstein bulls raised in the semi-arid region present a growth curve of the scrotal perimeter and sperm concentration compatible with a desirable fertility expectation.

**Keywords:** Cattle, Fertility, Holstein.

**Acknowledgements:** FACEPE (APQ 1371-5.05/21).

## Criopreservação de sêmen após tratamento de orquite não infectocontagiosa em touro: relato de caso

**Bruno de Almeida Barbosa<sup>1\*</sup>, Maurício de Faria Silva<sup>1</sup>, Tatiana Issa Uherara<sup>1</sup>, Milens Marcelo Frasca Belonci<sup>1</sup>, Júlio César de Costa<sup>1</sup>, Simone dos Reis Paulucci<sup>1</sup>, Pablo Eliezer Reculiano<sup>2</sup>, Victoria Alice Bastos Primo<sup>3</sup>, Rogério Giuffrida<sup>4</sup>, Caliê Castilho<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Tairana Central de Congelamento de Sêmen Ltda. – Presidente Prudente, SP, <sup>2</sup>Centro Universitário Maurício de Nassau Cacoal – UNINASSAU, RO, <sup>3</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, PR, <sup>4</sup>Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP

\*e-mail: brunoalmeidab15@gmail.com

Segundo dados da ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial) em 2022 foram criopreservadas 24.757.250 doses de sêmen, no entanto para atingir este volume é essencial reprodutores em boas condições clínicas e reprodutivas. A orquite, inflamação dos testículos, pode ser uni ou bilateral, transitória ou permanente, com aumento ou diminuição do volume testicular e ocorre geralmente devido a doenças infectocontagiosas ou traumatismo. Foi recebido em uma central comercial de congelamento de sêmen um touro da raça Nelore, com 25 meses de idade, pesando 710kg, apresentando aumento de volume testicular. Ao exame do aparelho reprodutor, foi observado aumento do testículo direito não sendo possível sua mensuração devido à falta de delimitação e não identificação correta de início e fim do testículo, à palpação foi detectado temperatura elevada, além de ausência de mobilidade. À termografia, foi detectada temperatura superior do testículo direito em relação ao contra-lateral. O testículo esquerdo apresentava-se normal medindo 9,5 cm de comprimento e 6,3 cm de largura (mensurados com auxílio de paquímetro), com perímetro escrotal de 45 cm (mensurado com auxílio de fita métrica metálica, na região medial), prepúcio e glândulas anexas sem alterações. No exame ultrassonográfico o testículo direito apresentou parênquima hipoecóico não sendo possível a visualização do mediastino. Os exames de quarentena apresentaram-se negativos para as seguintes doenças: *Campylobacter* pelo método Isolamento e Identificação bioquímica, *Trichomonas* por método direto do lavado prepucial, sendo os 4 exames a seguir realizados com intervalos de 7 dias entre eles, BVD (diarreia viral bovina) método ELISA-Ag, Febre Aftosa método Sistema ELISA 3ABC/EITB, brucelose por Antígeno Acidificado Tamponado (AAT), Tuberculose por Teste Cervical Simples, descartando-as como possíveis causas. Foi realizada coleta por eletroejaculador, cujo sêmen apresentou as seguintes características: volume 4 mL, motilidade de 40%, vigor 3, concentração abaixo de  $255 \times 10^6$  espermatozoides/mL, 30% de defeitos maiores com maior frequência para defeitos de acrossoma, gota proximal, cauda fortemente dobrada, 55% de defeitos menores com maior frequência cabeça isolada e gota distal, pressupondo assim a orquite unilateral direita. Foi instituído o tratamento com anti-inflamatório a base de meloxicam 0,5mg/kg (Maxicam 2%, Ouro Fino, Cravinhos-SP, Brasil) por 5 dias e ducha 2 vezes ao dia, sem remissão do processo testicular, ou seja, ausência de mobilidade e persistência do aumento de volume do testículo direito. À coleta, o ejaculado ainda apresentava baixa concentração ( $556 \times 10^6$  espermatozoides/mL), motilidade de 40% (análise subjetiva) e defeitos maiores acima de 25%, não possibilitando congelamento. Assim, novo protocolo medicamentoso iniciou-se 14 dias após o término do primeiro, utilizando o mesmo anti-inflamatório por mais 10 dias, com duchas diárias e pomada (DM-GEL, Vetnil, Louveira-SP, Brasil) 1 vez ao dia. Ao final do tratamento, foi possível delimitar o testículo direito por palpação, que voltou a ter mobilidade. Houve um decréscimo do perímetro escrotal para 43 cm, as mensurações de comprimento e largura do testículo direito foram de 11 cm e 6,5 cm respectivamente. O testículo esquerdo apresentava-se normal, com as mesmas medidas descritas anteriormente. Prepúcio e glândulas anexas sem alterações. As coletas de sêmen por vagina artificial foram então iniciadas, com intervalo de 3 dias entre elas, porém as 6 primeiras coletas foram reprovadas por baixa concentração e/ou excesso de defeitos espermáticos. Os defeitos observados com maior frequência foram: gota proximal, cabeça estreita na base, *knobbed sperm* e cauda fortemente dobrada, contudo tais alterações morfológicas foram diminuindo nas coletas subsequentes. O primeiro ejaculado criopreservado ocorreu 21 dias após o término do segundo tratamento, com volume de 2,72ml, concentração de  $994,3 \times 10^6$  espermatozoides/mL, motilidade de 60% e vigor 4 (análise subjetiva), defeitos maiores 12% (estreito na base e cauda fortemente dobrada os mais frequentes) e menores 3%. Após a primeira criopreservação, notou-se ainda uma oscilação entre coletas tendo aprovados e reprovados, e passado um período de aproximadamente 15 dias, a qualidade satisfatória para congelamento se estabilizou e o touro seguiu nas rotinas de coleta completando o contrato de 2000 doses. Conclui-se que touros com orquite de origem não infectocontagiosa podem produzir ejaculado com qualidade satisfatória para criopreservação após tratamento.

**Palavras chaves:** orquite, tratamento, qualidade seminal, sêmen bovino, criopreservação.

## Cryopreservation of semen after treatment of non-infectious contagious orchitis in bull: case report

**Bruno de Almeida Barbosa<sup>1\*</sup>, Maurício de Faria Silva<sup>1</sup>, Tatiana Issa Uherara<sup>1</sup>, Milens Marcelo Frasca Belonci<sup>1</sup>, Júlio César de Costa<sup>1</sup>, Simone dos Reis Paulucci<sup>1</sup>, Pablo Eliezer Reculiano<sup>2</sup>, Victoria Alice Bastos Primo<sup>3</sup>, Rogério Giuffrida<sup>4</sup>, Caliê Castilho<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Tairana Central de Congelamento de Sêmen Ltda. – Presidente Prudente, SP, <sup>2</sup>Centro Universitário Maurício de Nassau Cacoal – UNINASSAU, RO, <sup>3</sup>Universidade Estadual do Norte do Paraná – UENP, PR, <sup>4</sup>Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP

\*e-mail: brunoalmeidab15@gmail.com

According to the Brazilian Association for Artificial Insemination (ASBIA), 24.757.250 doses of semen were cryopreserved in 2022. However, to achieve this quantity, it is essential to reproduce in good clinical and reproductive conditions. Orchitis, an inflammation of the testis, can be unilateral or bilateral, temporary or permanent, associated with an increase or decrease in testicular volume, and usually occurs as a result of infectious disease or trauma. A 25-month-old, 710-kg Nellore bull with enlarged testicular volume was admitted to a commercial sperm freezing center. Examination of the reproductive system revealed enlargement of the right testis, which could not be measured because of the lack of demarcation and improper identification of the beginning and end of the testis. Thermography showed a higher temperature of the right testis compared with the contralateral testis. The left testis was normal, with a length of 9.5 cm and a width of 6.3 cm (measured by calipers), with a scrotal circumference of 45 cm (measured by a metal measuring tape in the medial region), prepuce and appendage glands without changes. On ultrasonography, the right testis showed hypoechoic parenchyma, so the mediastinum was not visible. Quarantine examinations were negative for the following diseases: campylobacter by the biochemical isolation and identification method, trichomonas by the direct method of foreskin washing, with the following 4 examinations performed 7 days apart: BVD (bovine viral diarrhea) ELISA-Ag method, Foot and Mouth Disease ELISA System 3ABC/EITB, Brucellosis by Acidified Buffered Antigen (AAT), Tuberculosis by Simple Cervical Test, so they were excluded as possible causes. Collection was performed with an electroejaculator whose semen had the following characteristics: volume 4 ml, motility 40%, vitality 3, concentration below  $255 \times 10^6$  spermatozoa/ml, 30% major defects with higher frequency for acrosome defects, proximal drop, severely curved tail, 55% minor defects, more frequent isolated head and distal gout, so unilateral right orchitis was assumed. Treatment with an anti-inflammatory drug based on meloxicam 0.5mg/kg (Maxicam 2%, Ouro Fino, Cravinhos- SP, Brazil) was initiated for 5 days and showered twice daily, with no regression of the testicular process, i.e. no mobility and persistent volume increase of the right testis. At collection, the ejaculate still had a low concentration ( $556 \times 10^6$  spermatozoa/ml), motility of 40% (subjective analysis) and major defects above 25%, which did not allow freezing. Therefore, 14 days after the end of the first treatment, a new drug protocol was started with the same anti-inflammatory drug for another 10 days, daily showers and once-daily application of an ointment (DM-GEL, Vetnil, Louveira- SP, Brazil). At the end of the treatment, it was possible to delineate the right testicle by palpation, which became mobile again. The testicular circumference decreased to 43 cm, and the measurements for length and width of the right testicle were 11 cm and 6.5 cm, respectively. The left testis was normal, with the same measurements as previously described. Foreskin and appendage glands without changes. Subsequently, semen collections were performed through the artificial vagina at 3-day intervals, and the first 6 collections were discarded because of insufficient concentration and/or excessive sperm defects. The most common defects observed were: proximal drop, narrow head at the base, knobby spermatozoa, and highly curved tail, but these morphological changes decreased in subsequent collections. The first cryopreserved ejaculate was collected 21 days after the end of the second treatment, with a volume of 2.72 ml, a concentration of  $994.3 \times 10^6$  spermatozoa/ml, a motility of 60% and a vitality of 4 (subjective analysis), major defects of 12% (narrow head at the base and strongly curved tail most frequent) and minor ones of 3%. After the first cryopreservation, there was still a variation between approved and rejected collections, and after a period of about 15 days, the satisfactory quality for freezing stabilized, and the bull continued the collection routine and completed the contract for 2000 doses. The conclusion is that bulls with orchitis of non-infectious/infectious cause can produce ejaculate of satisfactory quality for cryopreservation after treatment.

**Keywords:** orchitis, treatment, seminal quality, bovine semen, cryopreservation.

## Defeitos de acrossoma em ejaculados de touros búfalos (*Bubalus bubalis*) sob estresse térmico de curta duração

Arnaldo Algaranhar Gonçalves<sup>1</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>2\*</sup>, Giovanna Galhardo Ramos<sup>3</sup>, Thiago Velasco Guimarães Silva<sup>1</sup>, Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>4</sup>, Otávio Mitio Ohashi<sup>1</sup> (*in memoriam*)

<sup>1</sup> Laboratório de Fertilização *in vitro* – Universidade Federal do Pará, Belém-PA

<sup>2</sup> Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos-SP

<sup>3</sup> FMVZ/USP – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA

\*e-mail: alexandre.garcia @embrapa.br

A normalidade da espermatogênese nos mamíferos depende da manutenção do equilíbrio da termorregulação testicular. Nos bubalinos, a temperatura média escrotal varia de 4 a 7°C abaixo da temperatura interna corporal, para produção de espermatozoides férteis. Evidências científicas indicam que quando o índice de temperatura e umidade (ITU) supera o valor de 74, os touros bubalinos apresentam aumento significativo na incidência de alterações morfológicas dos espermatozoides, com mudanças na conformação da cauda, da peça intermediária e/ou da cabeça. Contudo, o conhecimento científico quanto às consequências do estresse térmico pelo calor sobre aspectos reprodutivos dos touros bubalinos ainda é escasso e poucos trabalhos investigaram a sensibilidade ou a resiliência desses animais quando expostos ao estresse calórico. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do estresse térmico testicular induzido e de curta duração em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e as possíveis modificações provocadas nos espermatozoides, tendo como foco a integridade da membrana acrossomal. O experimento foi realizado de julho a outubro de 2018, no município de Viseu, Pará. Cinco touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) (7,2±3,0 anos; 652±156,9 kg PV) foram utilizados como doadores de sêmen. Os animais foram mantidos em baias com acesso externo a piquete para pastejo. O período experimental foi dividido em quatro coletas controle antes da insulação testicular (dias -21, -14, -7 e 0; dia 0 = dia da insulação) e sete coletas pós-insulação testicular (dias 7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49). A insulação testicular foi realizada com bolsa isotérmica impermeável. A bolsa foi fixada na região do funículo espermático, de modo a promover a completa cobertura da superfície escrotal. A bolsa foi mantida durante 48 horas, com o objetivo de induzir um estresse térmico transitório de efeito localizado. Durante o período de insulação, a temperatura da superfície escrotal foi monitorada por termometria, 24 e 48 horas após a fixação da bolsa, sendo registrada elevação de 4,1°C na superfície escrotal. As coletas de sêmen foram realizadas utilizando vagina artificial pré-aquecida a 42°C. As amostras foram processadas e a integridade da membrana acrossomal foi determinada conforme técnica descrita por Celeghini et al. (2010) (doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x) com uso simultâneo das sondas fluorescentes iodeto de propídio (IP) e isotiocinato de fluoresceína-aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA). Após as coletas, o sêmen foi imediatamente levado ao laboratório, sem diluição inicial e sob temperatura controlada (36°C). As amostras foram associadas às sondas fluorescentes, incubadas por dez minutos a 38,5°C no escuro. Posteriormente, foram avaliadas 200 células por amostra em microscopia de epifluorescência, sob magnificação total de 1000x. Os resultados foram avaliados por análise de variância com medidas repetidas no tempo, e as médias comparadas pelo teste de Duncan (R *software* v3.5.1), com nível de significância de 5%. A característica de membrana acrossomal lesada não apresentou diferença significativa (P=0,81) entre as coletas do período de pós-insulação testicular. A média de membrana acrossomal lesada no período pré-insulação foi de 24.1±14.1%. No período de pós-insulação, as médias de membranas acrossomais lesadas foram: 24.9 ±9.9% (dia 7), 31.1±12.9% (dia 14), 32.2 ±16.2% (dia 21), 26.7 ±5.5% (dia 28), 20.5 ±9.1% (dia 35), 27.3 ±6.4% (dia 42), e 26.6 ±9.1% (dia 49). A integridade da membrana acrossomal é um dos pré-requisitos para a normalidade do processo de fecundação. Neste trabalho, não foi possível observar qualquer supressão significativa dessa característica no sêmen de touros bubalinos, ao longo do tempo, após o estresse térmico agudo causado pelo aumento induzido da temperatura escroto-testicular. Dessa maneira, a hipertermia induzida não foi capaz de provocar danos significativos no processo de diferenciação das organelas espermáticas, ao menos quanto à constituição do acrossoma e à sua integridade. Hipoteticamente, os epitélios seminífero e epididimário foram capazes de promover ação efetiva do sistema antioxidante e minimizar danos em escala à estrutura acrossomal. Contudo, trabalhos adicionais são necessários para aprofundar o conhecimento quanto à intensidade e à duração do estresse calórico nas características espermáticas e respostas fisiológicas de touros bubalinos. Esse tipo de informação é bastante relevante quando se considera que a maior parte da população de bubalinos é criada em países localizados na região intertropical.

**Palavras-chave:** Andrologia Animal, bubalinos, estresse calórico, membrana acrossomal.



## Acrosomal sperm defects of water buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) after short-term heat stress

Arnaldo Algaranhar Gonçalves<sup>1</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>2\*</sup>, Giovanna Galhardo Ramos<sup>3</sup>, Thiago Velasco Guimarães Silva<sup>1</sup>, Sebastião Tavares Rolim Filho<sup>4</sup>, Otávio Mítio Ohashi<sup>1</sup> (*in memoriam*)

<sup>1</sup>Laboratório de Fertilização *in vitro* – Universidade Federal do Pará, Belém-PA

<sup>2</sup>Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos-SP

<sup>3</sup>FMVZ/USP – Universidade de São Paulo, Pirassununga-SP

<sup>4</sup>Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA

\*e-mail: alexandre.garcia@embrapa.br

Normality of spermatogenesis in mammals depends on maintaining the balance of testicular thermoregulation. In water buffalo, the average scrotal temperature varies between 4 and 7 °C below the internal body temperature to produce fertile sperm. Scientific evidence suggests that when the temperature and humidity index (THI) exceeds 74, water buffalo bulls exhibit a significant increase in the frequency of sperm morphological changes, with changes in the morphology of the tail, midpiece, and/or head. However, scientific knowledge on the consequences of heat stress on the reproductive aspects of buffalo bulls is still scarce, and few studies have investigated the sensitivity or resilience of these animals to heat stress. Thus, the aim of the study was to evaluate the effects of short-term induced heat stress in the testes of water buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) and the possible changes in spermatozoa, focusing on the integrity of the acrosome membrane. The experiment was conducted from July to October 2018 in Viseu, Pará. Five buffalo bulls (7.2±3.0 years; 652±156.9 kg LW) were used as semen donors. The animals were housed in pens with access to a pasture area. The experimental period was divided into four control semen collections before testicular insulation (days -21, -14, -7, and 0; day 0 = day of insulation) and seven semen collections after testicular insulation (days 7, 14, 21, 28, 35, 42, and 49). Testicular insulation was performed using an impermeable isothermal bag. The bag was fixed in the region of the spermatic cord, to promote complete coverage of the scrotal surface. The bag was maintained for 48 hours, to induce a transient thermal stress with a localized effect. During insulation, scrotal surface temperature was monitored thermometrically at 24 and 48 hours after bag attachment, and an increase of 4.1 °C was detected. Semen collections were performed in an artificial vagina prewarmed to 42 °C. Samples were processed and acrosomal membrane integrity was determined according to the technique proposed by Celeghini et al. (2010) (doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x) using the fluorescent probes propidium iodide (PI) and *Pisum sativum* agglutinin-fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA) simultaneously. After collection, the semen was immediately taken to the laboratory without pre-dilution and at controlled temperature (36 °C). Samples were added to the fluorescent probes and incubated for ten minutes at 38.5 °C in the dark. Subsequently, 200 cells per sample were evaluated by epifluorescence microscopy at a total magnification of 1000x. Results were evaluated by analysis of variance with repeated measures over time, and means were compared using Duncan's test (R software v3.5.1) with a significance level of 5%. The damaged acrosome membrane showed no significant difference (P=0.81) between semen collections in the post-testicular insulation period. The average of damaged acrosome membrane in the preinsulation period was 24.1±14.1%. In the post-insulation period, the average of damaged acrosome membranes was: 24.9±9.9% (day 7), 31.1±12.9% (day 14), 32.2±16.2% (day 21), 26.7±5.5% (day 28), 20.5±9.1% (day 35), 27.3±6.4% (day 42), and 26.6±9.1% (day 49). The integrity of the acrosomal membrane is one of the prerequisites for the normality of the fertilization. In this work, it was not possible to observe any significant suppression of acrosomal integrity in the semen of buffalo bulls, over time, after acute heat stress caused by the induced increase in scrotal-testicular temperature. Thus, the induced hyperthermia could not cause significant damage to the process of differentiation of sperm organelles, at least in terms of the constitution of the acrosome and its integrity. Hypothetically, the seminiferous and epididymal epithelium were able to promote an effective action of the antioxidant system and minimize damages to the acrosome. However, additional research is needed to deepen the knowledge regarding the intensity and duration of heat stress on sperm characteristics and physiological responses of buffalo bulls. This information is relevant when considering that most of the water buffalo population is raised in countries in the intertropical region.

**Keywords:** Animal Andrology, water buffalo, heat stress, acrosome.



## Efeito da adição de colesterol ao meio de congelamento de sêmen de bovino pantaneiro sobre a produção *in vitro* de embriões

Fernanda Guadagnin<sup>1</sup>, Cássia Panizzon Dal Curtivo<sup>2</sup>, Thaiza Thommen Maciel Preti<sup>2</sup>, Walter Augusto dos Santos<sup>3</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>1</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) *campus* Cuiabá, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>ABS Pecplan, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT) *campus* São Vicente, São Vicente, MT, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT, Brasil  
\*e-mail:tfmotheo@gmail.com

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de colesterol ao meio de congelamento de sêmen de bovino Pantaneiro sobre a produção *in vitro* de embriões (PIVE). O sêmen foi coletado de um único touro Pantaneiro de fertilidade comprovada por eletroejaculação. A amostra seminal foi subjetivamente avaliada quanto ao volume, turbilhonamento, motilidade, vigor espermáticos e concentração e morfologia espermáticas. Esta por sua vez, apresentou parâmetros dentro do recomendado para a espécie bovina. Em seguida, o ejaculado foi dividido e distribuído em 2 tratamentos: T0 (Controle) – meio Tris + 0 mg/mL de Colesterol Carreado por Ciclodextrina – CCC (Cholesterol–methyl– $\beta$ –cyclodextrin) e T1,5 – Tris +1,5 mg/mL de CCC. A diluição foi realizada para a obtenção de concentração final de  $120 \times 10^6$ /mL de espermatozoides (sptz) viáveis. Após homogeneização, as alíquotas foram incubadas por 15 min em banho Maria a 37 °C e posteriormente rediluídas em meio Tris-gema (Tris + 40% de gema de ovo + 12 % de glicerol) para obtenção de concentração final de  $60 \times 10^6$  sptz viáveis/mL. Cada alíquota foi envasada em palhetas de 0,5mL ( $30 \times 10^6$  espermatozoides viáveis/palheta), as quais foram refrigeradas à 5°C por 4 horas. As palhetas foram colocadas em vapor de nitrogênio por 20 minutos, imersas em nitrogênio líquido e alocadas em botijão criogênico até análise. Para a produção *in vitro* de embriões (PIVE), os ovários foram provenientes de abatedouro e os complexos *cumulus*-oócitos (COC) foram recuperados e classificados em Grau I, II, III e IV. Somente COCs Grau I e II (n=528), foram submetidos a PIVE. Sendo assim, os COCs foram igualmente distribuídos em 2 grupos experimentais (T0 e T1,5; n= 264 COCs/tratamento) e submetidos a maturação *in vitro* (MIV) em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em ar, temperatura de 38,5°C e 95% de umidade por 24 horas. Após a MIV, os COCs (n= 444; T0: 228 e T1,5: 216) foram removidos e lavados três vezes em meio de TALP-FIV e transferidos para gotas contendo meio FIV. Em seguida, as gotas foram fecundadas de acordo com a concentração de colesterol carreado por ciclodextrina (CCC) utilizada durante o processo de criopreservação do sêmen, ou seja, T0 – FIV com sêmen + 0 mg/mL CCC e T1,5 – FIV com sêmen +1,5 mg/mL de CCC. A dose inseminante utilizada foi de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL e, antes de ser incubado com os COCs, o sêmen foi preparado em gradiente de Percoll® 45 e 90%. A FIV foi realizada em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> em ar, temperatura de 38,6°C e 95% de umidade por 18 horas. Após este processo, as estruturas foram “desnudadas” e transferidas para o cultivo *in vitro* (CIV) o qual foi realizado em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub> em ar, temperatura de 38,7°C e 95% de umidade por 8 dias. No D2 do cultivo foi realizado *feeding* e avaliada a taxa de clivagem. No D7, os embriões foram classificados e foi avaliada a taxa de blastocistos produzidos e no D8 foi avaliada a taxa de eclosão dos blastocistos. Ademais, foi realizada a contagem de células embrionárias totais e apoptóticas pelo método de coloração diferencial em embriões bovinos. O tratamento do sêmen de bovino Pantaneiro com a concentração de 1,5 mg/mL de CCC resultou em decréscimo no número de estruturas clivadas (T0: 144 *versus* T1,5: 72), porcentagem de estruturas clivadas (T0: 63% *versus* T1,5: 33%), número de blastocistos (T0: 72 *versus* T1,5: 24) e de blastocistos expandidos (T0: 72 *versus* T1,5: 12) e contagem de células embrionárias totais (T0: 1296 *versus* T1,5: 60) (P<0,001). Não foram constatadas diferenças significativas nos demais parâmetros avaliados. Sendo assim, conclui-se que a adição de colesterol carreado por ciclodextrina na concentração de 1,5 mg/mL ao meio de congelamento de sêmen de bovino pantaneiro é deletéria no processo de produção *in vitro* de embriões. Entretanto, mais estudos avaliando a adição de menores concentrações de colesterol ao meio de congelamento seminal de touros Pantaneiros, são essenciais para elucidar o real efeito deste sobre a produção *in vitro* de embriões.

**Palavras-chave:** bovinos localmente adaptados, ácidos graxos poli-insaturados, capacitação espermática, fertilização *in vitro*

## Impact of the use of cholesterol-enriched freezing extender in Pantaneiro bull semen on *in vitro* embryo production

Fernanda Guadagnin<sup>1</sup>, Cássia Panizzon Dal Curtivo<sup>2</sup>, Thaiza Thommen Maciel Preti<sup>2</sup>, Walter Augusto dos Santos<sup>3</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>1</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) *campus* Cuiabá, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>ABS Pecplan, Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT) *campus* São Vicente, São Vicente, MT, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT, Brasil  
\*e-mail:tfmotheo@gmail.com

The aim of this study was to investigate the effect of the addition of cholesterol to the freezing medium of Pantaneiro bovine semen on *in vitro* embryo production (IVP). Semen was collected from a single Pantaneiro bull of proven fertility via electroejaculation. Sperm volume, mass movement, total and progressive motility, concentration and morphology were assessed and filled the recommended range for bovine species. The ejaculate was divided into two treatments: T0 (Control) – Tris extender with 0 mg/mL of Cholesterol Carried by Cyclodextrin (CCC) and T1.5 – Tris extender with 1.5 mg/mL CCC. After dilution, the final concentration of viable spermatozoa was  $120 \times 10^6$ /mL. The aliquots were incubated for 15 minutes in water bath at 37°C, re-diluted in Tris-yolk extender, and packaged in 0.5 mL straws ( $30 \times 10^6$  viable spermatozoa/straw), which were chilled at 5°C for 4 hours. The straws were then placed in nitrogen vapor for 20 minutes, immersed in liquid nitrogen, and stored in a cryogenic container until analysis. For *in vitro* embryo production (IVP), cumulus-oocyte complexes (COC) were recovered from ovaries obtained from a slaughterhouse and classified into Grades I, II, III, and IV. Only Grades I and II COCs (n=528) underwent IVP. Thus, COCs were equally assigned to two experimental groups (T0 and T1.5; n= 264 COCs/treatment) and were submitted to *in vitro* maturation (IVM) in a 5% CO<sub>2</sub>, 38.5°C, and 95% humidity incubator for 24 hours. After IVM, the COCs (n= 444; T0: 228 e T1,5: 216) were washed three times in TALP-FIV medium and transferred to drops containing IVF medium. Then, drops were fertilized according to the concentration of CCC used during the semen cryopreservation process: T0 – IVF with semen + 0 mg/mL CCC and T1.5 – IVF with semen + 1.5 mg/mL CCC. The insemination dose used was  $1 \times 10^6$  spermatozoa/mL, and before incubation with the COCs, the semen was submitted to Percoll® 45 and 90% gradient. IVF was performed in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> in air, 38.6°C, and 95% humidity for 18 hours. After IVF, the structures were denuded and transferred to *in vitro* culture (IVC), which was carried out in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> in air, 38.7°C, and 95% humidity for 8 days. Feeding was performed on day 2 of culture, and the cleavage rate was evaluated. On day 7, the embryos were classified, and the rate of blastocysts production was evaluated. On day 8, the blastocyst hatching rate was evaluated. Total and apoptotic embryonic cell counts were performed using the differential staining method for bovine embryos. The treatment of Pantaneiro bovine semen with 1.5 mg/mL of CCC resulted in a decrease in the number of cleaved structures (T0: 144 versus T1.5: 72), percentage of cleaved structures (T0: 63% versus T1.5: 33%), number of blastocysts (T0: 72 versus T1.5: 24), number of expanded blastocysts (T0: 72 versus T1.5: 12), and total embryonic cell count (T0: 1296 versus T1.5: 60) (P<0.001). No significant differences were observed in other evaluated parameters. Thus, these findings suggest that the addition of 1.5 mg/mL CCC to the freezing extender of Pantaneiro bovine semen has negative effects on *in vitro* embryo production. However, more studies evaluating the addition of lower concentrations of cholesterol to the seminal freezing medium of Pantaneiro bulls are essential to elucidate its real effect on *in vitro* embryo production.

**Keywords:** locally adapted cattle, polyunsaturated fatty acids, sperm capacitation, *in vitro* fertilization

## Efeito da suplementação vitamínico-aminoácido-mineral sobre a qualidade do sêmen de reprodutores bovinos em regime de Central de Coleta e Processamento de Sêmen

André Maciel Crespilho<sup>1\*</sup>, Ana Beatriz Marques Almeida<sup>2</sup>, Matheus Henrique Vargas Oliveira<sup>1</sup>, Mariana Francolino Silva<sup>3</sup>, Rafael Rocha Paula<sup>1</sup>, Luiz Felipe Canela Souza<sup>1</sup>, Larysse Aparecida Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo; Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo, SP

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina, UEL, Paraná, SP

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP

\*e-mail: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

A nutrição corresponde a um dos fatores que mais impacta na performance reprodutiva de touros. Embora reprodutores de Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) sejam alimentados com dietas balanceadas, que atendem as necessidades individuais nas diferentes fases de vida dos animais, se reconhece que macro e micronutrientes podem representar importantes adjuvantes de qualidade seminal. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da suplementação vitamínico-aminoácido-mineral sobre a produção e qualidade seminal de touros alojados em CCPS. Para o estudo foram selecionados nove touros com histórico de baixa qualidade seminal, alojados na Central Bela Vista (Botucatu/SP). Todos os animais foram submetidos a suplementação vitamínico-aminoácido-mineral (Botumix® Touro, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) a base de beta caroteno, L-carnitina, ômega 3, coenzima Q10, zinco, vitamina C, vitamina B12, vitamina E e selênio. Os reprodutores foram suplementados por via oral, na dose 70mL, uma vez ao dia durante 60 dias (semanas 1 a 8). Ejaculados de todos os reprodutores foram colhidos semanalmente, englobando o período de suplementação vitamínica e mineral (semanas 1 a 8), além do período pós-tratamento (semanas 10 a 12 dias). As amostras foram avaliadas imediatamente após a coleta e pós-descongelamento quanto aos parâmetros de motilidade total (MT, %), vigor (0-5) e morfologia espermática (%) nas semanas 1, 4, 8, 10, 11 e 12 (n=176 ejaculados). Os dados gerados foram submetidos a análise de variância com medidas repetidas no tempo, empregando software Sigma Plot 12.0, considerando  $P < 0,05$ . Não foram observadas variações para o volume dos ejaculados ao longo do período de suplementação. A concentração espermática ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) foi maior na 11ª semana ( $648,1 \pm 56,7$ ) em relação à primeira semana de tratamento ( $440,6 \pm 39,5$ ;  $P=0,037$ ). Foi observado aumento significativo da motilidade total do sêmen fresco na 10ª semana ( $67,2 \pm 3,6$ ) em relação à semana 4 ( $52,9 \pm 5,8$ ). O vigor espermático foi significativamente superior na semana 10 ( $3,7 \pm 0,1$ ) em contraste à quarta semana ( $2,9 \pm 0,2$ ). Da mesma forma, foi observado menor porcentagem de defeitos maiores e menores na 11ª semana ( $20,4 \pm 2,2$ ;  $5,0 \pm 0,3$ , respectivamente) quando comparada a 4ª semana ( $32,0 \pm 2,9$ ;  $11,0 \pm 1,5$ , respectivamente) de suplementação. Para o sêmen pós-descongelamento foram observados resultados superiores para a motilidade ( $P=0,036$ ) e vigor ( $P=0,037$ ) no período pós-tratamento, ou seja, na semana 10 (MT:  $23,6 \pm 5,6$ ; vigor:  $1,9 \pm 0,4$ ) e semana 11 (MT:  $25,3 \pm 7,3$ ; vigor:  $2,0 \pm 0,5$ ) em comparação a semana 8 (MT:  $6,7 \pm 4,5$ ; vigor:  $0,5 \pm 0,3$ ). Do ponto de vista produtivo foi observado aumento do número médio de doses de sêmen congelado produzidas quando comparada a 1ª semana do estudo ( $17,6 \pm 10,3$ ) em relação ao período pós-suplementação (10ª semana =  $125,7 \pm 42,5$ ; 11ª semana =  $129,5 \pm 38,0$ ;  $P=0,011$ ). Após o término do tratamento (semana 12) foi constatado o retorno (queda da cinética e aumento de defeitos morfológicos do sêmen fresco) dos parâmetros espermáticos aos valores iniciais, que se fixaram em proporções semelhantes aos observados na 1ª semana do estudo ( $P < 0,05$ ). Resultados semelhantes foram observados para o sêmen pós-descongelamento, onde o vigor e número de doses produzidas na 12ª semana foi similar a 1ª semana do estudo ( $P < 0,05$ ). A melhora na qualidade seminal dos touros suplementados a partir da décima semana provavelmente se justifica pela ocorrência de um novo ciclo espermático ( $\cong 60$  dias) favorecido pelo acréscimo de substâncias biologicamente ativas voltadas à espermatogênese. Possivelmente, o aporte nutricional extra de L-carnitina foi capaz de aumentar a cinética espermática durante e após a suplementação dos animais, atuando no transporte de ácidos graxos para a matriz mitocondrial. Ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega 3, são essenciais para a manutenção da estrutura e integridade da membrana plasmática, favorecendo a proteção durante o processo de congelamento. A combinação dos nutrientes possivelmente impactou a produção espermática testicular e maturação epididimária. A descontinuidade do tratamento foi acompanhada pela regressão da qualidade espermática, indicando a necessidade de fornecimento contínuo dos macro e micronutrientes presentes na fórmula do produto. Conclui-se que a suplementação vitamínico-aminoácido-mineral pode atuar como adjuvante para touros com histórico de baixa qualidade espermática, permitindo o aumento da produção de doses de sêmen bovino e, conseqüentemente, melhorando o desempenho reprodutivo.

**Palavras-chave:** Bovinos; Beta Caroteno; L-Carnitina; Reprodução; Sêmen.

## Effect of vitamin-amino acid-mineral supplementation on semen quality of bulls housed in Semen Collection and Processing Centers

André Maciel Crespilho<sup>1\*</sup>, Ana Beatriz Marques Almeida<sup>2</sup>, Matheus Henrique Vargas Oliveira<sup>1</sup>, Mariana Francolino Silva<sup>3</sup>, Rafael Rocha Paula<sup>1</sup>, Luiz Felipe Canela Souza<sup>1</sup>, Larysse Aparecida Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo; Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo, SP

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Londrina, UEL, Paraná, SP

<sup>3</sup>Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, SP

\*E-mail: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

Nutrition corresponds to one of the main factors that impact the reproductive performance of bulls. Although bulls from Semen Collection and Processing Centers (CCPS) are fed balanced diets, which meet the individual needs in the different stages of life, it is recognized that macro and micronutrients can represent important adjuvants of seminal quality. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of vitamin-amino acid-mineral supplementation on the production and seminal quality of bulls housed in CCPS. For the study, nine bulls with a history of low seminal quality, housed in Central Bela Vista (Botucatu/SP), were selected. All animals underwent vitamin-amino acid-mineral supplementation (Botumix® Touro, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil) based on beta carotene, L-carnitine, omega 3, coenzyme Q10, zinc, vitamin C, vitamin B12, vitamin A and selenium. The bulls were supplemented orally, at a dose of 70mL, once a day for 60 days (week 1 to 8). Ejaculates from all males were collected weekly, encompassing the period of vitamin and mineral supplementation (weeks 1 to 8), in addition to the post-treatment period (weeks 10 to 12 days). Samples were evaluated immediately after collection and post-thawing for parameters of total motility (MT, %), vigor (0-5) and sperm morphology (%) at weeks 1, 4, 8, 10, 11 and 12 (n=176 ejaculates). The data were submitted to analysis of variance with repeated measures over time, using Sigma Plot 12.0 software, considering  $P < 0.05$ . No variations were observed for the volume of ejaculates over the supplementation period. Sperm concentration ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) was higher at week 11 ( $648.1 \pm 56.7$ ) compared to week 1 ( $440.6 \pm 39.5$ ) of treatment ( $P = 0.037$ ). A significant increase in total motility of fresh semen was observed in the 10th week ( $67.2 \pm 3.6$ ) compared to week 4 ( $52.9 \pm 5.8$ ). Sperm vigor was significantly higher at week 10 ( $3.7 \pm 0.1$ ) in contrast to week 4 ( $2.9 \pm 0.2$ ). Likewise, lower percentage ( $P < 0.05$ ) of major and minor defects was observed in the 11th week ( $20.4 \pm 2.2$ ;  $5.0 \pm 0.3$ , respectively) when compared to the 4th week ( $32.0 \pm 2.9$ ;  $11.0 \pm 1.5$ , respectively). For post-thawing semen, superior results were observed for motility ( $P = 0.036$ ) and vigor ( $P = 0.037$ ) in the post-treatment period, that is, at week 10 (MT:  $23.6 \pm 5.6$ ; vigor:  $1.9 \pm 0.4$ ) and week 11 (MT:  $25.3 \pm 7.3$ ; vigor:  $2.0 \pm 0.5$ ) compared to week 8 (MT:  $6.7 \pm 4.5$ ; vigor:  $2.0 \pm 0.5$ ). From the productive aspect, increase in the average number of doses of frozen semen was observed when compared to the 1st week of the study ( $17.6 \pm 10.3$ ) in relation to the post-supplementation period (10th week =  $125.7 \pm 42.5$ ; 11th week =  $129.5 \pm 38.0$ ;  $P = 0.011$ ). A return (decrease in kinetics and increase in morphological defects) of initial sperm parameters was observed at week 12, equivalent to 1 month after the end of supplementation in fresh semen ( $P < 0.05$ ). And in thawed semen, the vigor and number of doses produced in the 12th week was similar to the 1st week of the study ( $P < 0.05$ ). The improvement in the seminal quality of bulls supplemented from the tenth week on is probably explained by the occurrence of a new sperm cycle ( $\cong 60$  days) favored by the addition of biologically active substances aimed at spermatogenesis. Possibly, the extra nutritional intake of L-carnitine was able to increase sperm kinetics during and after supplementation of the animals, acting on the transport of fatty acids to the mitochondrial matrix. Polyunsaturated fatty acids, such as omega 3, are essential for maintaining the structure and integrity of the plasma membrane, favoring protection during the freezing process. The nutrient combination possibly impacted testicular and epididymal sperm maturation. Discontinuation of treatment was accompanied by regression of sperm quality, indicating the need for continuous supply of macro and micronutrients present in the product formula. It is concluded that vitamin-amino acid-mineral supplementation can act as an adjuvant for bulls with a historic of low sperm quality, allowing increased production of bovine semen doses and, consequently, improving reproductive performance.

**Keywords:** Cattle; Beta Carotene; L-Carnitine; Reproduction; Semen.

## Efeito do consumo alimentar residual sobre a fertilidade de touros: uma revisão sistemática e meta-análise

Milena Alves da Silva<sup>1</sup>, Wilson Júnior Alcebiades<sup>1</sup>, Arthur Ribeiro Torres<sup>1</sup>, Adalberto Rocha Lobo<sup>1</sup>, Claudia Braga Pereira Bento<sup>1</sup>, Thiago Vasconcelos Melo<sup>1</sup>, Jeanne Broch Siqueira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus de Unai, MG, Brasil

\*e-mail: [jeanne.siqueira@ufvjm.edu.br](mailto:jeanne.siqueira@ufvjm.edu.br)

O consumo de ração residual (CAR) é um indicador utilizado na linha de seleção para eficiência alimentar, onde animais CAR negativos são considerados eficientes, e CAR positivos, são ineficientes. Ele expressa a diferença entre uma ingestão real média e seu consumo estimado. A seleção de animais eficientes para CAR, pode resultar em progênies que consomem menos alimento, porém que não apresentam efeitos negativos sobre seu desempenho; todavia é necessário avaliar a relação do CAR com as demais características de importância econômica, como a eficiência reprodutiva dos machos. Desta forma, o objetivo desta revisão sistemática foi selecionar artigos que demonstrassem o efeito da seleção para o CAR sobre características de fertilidade em touros, para posteriormente, por meio do estudo de meta-análise, verificar se há ou não concordância entre o CAR e a fertilidade de touros. Inicialmente, foi realizada uma busca na plataforma *Scopus*, utilizando uma associação entre termos (palavras-chave) relacionados à espécie, ao CAR/eficiência alimentar e a fertilidade de machos, intercalados pelos operadores booleanos OR e AND. Ao utilizar a combinação de palavras-chave, a busca sistemática encontrou um total de 312 resultados, que passaram por um processo de triagem com objetivo de selecionar apenas artigos científicos, nos idiomas português e/ou inglês, que possuísem ao menos um termo de cada grupo (espécie, eficiência alimentar/CAR, reprodução) no título, abstract e ou palavras-chave, que tratassem exclusivamente de touros, tivessem análises de variáveis semelhantes e que através de dados numéricos estabelecem uma correlação entre o CAR e a fertilidade dos touros, resultando em 06 publicações. Em relação às características reprodutivas dos touros, as avaliações para a quantidade de espermatozoides normais, o volume dos testículos, a concentração do sêmen, anormalidades de cabeça espermática e a termografia da parte proximal e distal do escroto não apresentaram diferenças entre animais avaliados pelo índice de CAR. Porém, em relação ao perímetro escrotal, a viabilidade espermática, a motilidade espermática progressiva e a intensidade de pixels do parênquima testicular, houve um efeito da seleção dos animais por CAR, em que o grupo de animais eficientes apresentaram valores inferiores quando comparado com o grupo de animais ineficientes, indicando piora das características reprodutivas nos animais eficientes. Observou-se heterogeneidade presente nas variáveis CAR e motilidade espermática, avaliada por metaregressão e análise de subgrupos, explicada pela diversidade dos padrões raciais tanto quanto pela idade dos animais e consequente maturidade reprodutiva. Frente aos trabalhos analisados, nota-se que o CAR tem o potencial de melhorar a lucratividade do sistema de produção de carne bovina, visto o potencial incremento da eficiência alimentar, entretanto, em razão da importância econômica de índices reprodutivos, são necessárias mais pesquisas que explorem associações entre CAR e fertilidade em bovinos. A seleção de animais melhoradores deve ser realizada com sensatez, considerando variáveis economicamente relevantes, como CAR, características produtivas e reprodutivas, para que seja possível realizar uma seleção equilibrada e harmônica de touros melhoradores para a pecuária brasileira.

**Palavras-chave:** circunferência escrotal, eficiência alimentar, qualidade de sêmen, touro.



## Effect of residual food intake on bull fertility: a systematic review and meta-analysis

Milena Alves da Silva<sup>1</sup>, Wilson Júnior Alcebiades<sup>1</sup>, Arthur Ribeiro Torres<sup>1</sup>, Adalfredo Rocha Lobo<sup>1</sup>, Claudia Braga Pereira Bento<sup>1</sup>, Thiago Vasconcelos Melo<sup>1</sup>, Jeanne Broch Siqueira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Campus de Unai, MG, Brasil

\*Autor para correspondência: jeanne.siqueira@ufvjm.edu.br

Residual feed intake (RFI) is an indicator used in the selection line for feed efficiency, where negative RFI animals are considered efficient, and positive RFI animals are inefficient. It expresses the difference between an average actual intake and its estimated consumption. The selection of efficient animals for RFI may result in progenies that consume less food, but do not have negative effects on their performance; however, it is necessary to evaluate the relationship of the RFI with other characteristics of importance for the productivity of the herd, such as the reproductive efficiency of males. Thus, the objective of this systematic review was to select articles that demonstrated the effect of selection for RFI on fertility characteristics in bulls, to later, through the meta-analysis study, verify whether or not there is agreement between CAR and bull fertility. Initially, a search was performed on the Scopus platform, using an association between terms (keywords) related to the species, the RFI /feed efficiency and the fertility of males, interspersed by the Boolean operators OR and AND. When using the combination of keywords, the systematic search found a total of 312 results, which went through a screening process in order to select only scientific articles, in the languages Portuguese and/or English, that had at least one term from each group (species, feed efficiency/ RFI, reproduction) in the title, abstract and/or keywords, that dealt exclusively with bulls, had analyses of similar variables and that through numerical data established a correlation between RFI and bull fertility, resulting in 06 publications. Regarding the reproductive characteristics of the bulls, the evaluations for the amount of normal spermatozoa, the volume of the testicles, the concentration of semen, abnormalities of the spermatic head and the thermography of the proximal and distal part of the scrotum did not present differences between animals evaluated by the CAR index. However, in relation to the scrotal perimeter, sperm viability, progressive sperm motility and intensity of testicular parenchyma pixels, there was an effect of the selection of animals by CAR, in which the group of efficient animals presented lower values when compared to the group of inefficient animals, indicating worsening of reproductive characteristics in efficient animals. Heterogeneity was observed in the variables RFI and sperm motility, evaluated by metaregression and subgroup analysis, explained by the diversity of racial patterns as well as by the age of the animals and consequent reproductive maturity. In view of the studies cited, it is noted that the RFI has the potential to improve the profitability of the beef production system, given the increase in feed efficiency, however, due to the economic importance of reproductive indices, more research is needed to explore associations between RFI and fertility in cattle. The selection of breeding animals should be carried out sensibly, considering economically relevant variables, such as RFI, productive and reproductive characteristics, so that it is possible to carry out a balanced and harmonious selection of breeding bulls for Brazilian livestock.

**Keywords:** bulls, scrotal circumference, feed efficiency, semen quality



## Efeito do inseminador e do touro sobre os resultados da inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte

Alex Adriano Cavalcante Ferreira<sup>1</sup>; Raquel Gomes do Amaral<sup>1</sup>; Maria Antonia Moreira Maciel<sup>1</sup>; Avelino Velloso Ferreira Murta<sup>2</sup>; Tiago Oliveira Brandão<sup>2</sup>; Caio Victor Damasceno Carvalho<sup>1</sup>; Alexandra Soares Rodrigues<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Oeste da Bahia, *Campus Barra*, Barra, Bahia, Brasil; <sup>2</sup>Instituto Federal do Norte de Minas Gerais, *Campus Salinas*, Salinas, MG, Brasil

\*e-mail:alexandra.rodrigues@ufob.edu.br

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) pode ter resultados impactados por diversos fatores. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do touro e inseminador sobre a taxa de concepção de fêmeas submetidas a um programa de IATF. Para tanto, utilizou-se informações de 6.011 fêmeas bovinas de corte da categoria plurípara e média de Escore de Condição Corporal de  $2,9 \pm 0,42$ , na escala de 0 a 5, avaliada visualmente no início do protocolo para IATF. Todos os animais eram mantidos a pasto com suplementação mineral e água *ad libitum*. Previamente ao início do experimento, as fêmeas foram submetidas a uma avaliação reprodutiva utilizando-se a ultrassonografia transretal com um transdutor linear de 5Mhz (dp10 Mindray, Shenzhen, China), somente dados de animais sem registro de anormalidades reprodutivas foram usadas para análise. As vacas foram submetidas a um protocolo que iniciou em um dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0) sendo realizada a aplicação de 2mg de Benzoato de Estradiol (Gonadiol, Zoetis, São Paulo, Brasil) e inserido o implante de Progesterona (P4) (CIDR, Zoetis, São Paulo, Brasil) de primeiro uso; no dia sete (D7), administrou-se 12,5mg de dinoprost trometamina (Lutalyse, Zoetis, São Paulo, Brasil); no dia nove (D9) os implantes de P4 foram removidos, realizou-se aplicação de 300 U.I. de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 0,6mg de cipionato de estradiol (E.C.P., Zoetis, São Paulo, Brasil). Finalmente no dia onze (D11), foi realizada a inseminação artificial (IA), por 16 distintos técnicos de IA. Foi utilizado sêmen criopreservado comercializado de 54 touros da raça Nelore. O sêmen foi descongelado à temperatura de 37°C por 30 segundos. A concepção foi diagnosticada por meio da ultrassonografia transretal, com um transdutor linear de 5Mhz (dp10 Mindray, Shenzhen, China), 40 dias após a inseminação artificial. Sendo considerado diagnóstico de gestação positivo, os animais com presença de um embrião visível com viabilidade confirmada (batimento cardíaco). Para avaliar a interferência das variáveis de interesse, foi utilizada a análise multivariada de regressão logística binária. O inseminador influenciou os índices de fertilidade ( $P < 0,05$ ), havendo o incremento de 1,02 vezes na taxa de concepção entre os 16 técnicos de IA. No que se refere ao touro, foi utilizado sêmen congelado de 57 reprodutores diferentes, da raça Nelore, onde houve interferência sobre a taxa de concepção ( $P < 0,05$ ), havendo o aumento de 1,00 vezes nas chances de concepção entre os touros. O técnico em IA, e o touro, influenciaram os resultados da IATF, devendo ser utilizados técnicos experientes e touros com sêmen de alta viabilidade durante a execução da técnica. Portanto, estes fatores devem ser avaliados para o emprego de programas de IATF, permitindo resultados satisfatórios com a execução desta biotécnica.

**Palavras-chave:** *Bos taurus indicus*, inseminação, taxa de concepção, touro.

## Effect of the inseminator e the bull in the results of the Fixed-Time Artificial Insemination in beef cattle

Alex Adriano Cavalcante Ferreira<sup>1</sup>; Raquel Gomes do Amaral<sup>1</sup>; Maria Antonia Moreira Maciel<sup>1</sup>; Avelino Velloso Ferreira Murta<sup>2</sup>; Tiago Oliveira Brandão<sup>2</sup>; Caio Victor Damasceno Carvalho<sup>1</sup>; Alexandra Soares Rodrigues<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Federal University of West Bahia, *Campus Barra*, Barra, Bahia, Brazil; <sup>2</sup>Federal Institute of Northern Minas Gerais, *Campus Salinas*, Salinas, MG, Brazil

\*e-mail: alexandra.rodrigues@ufob.edu.br

Fixed-time artificial insemination (FTAI) can have results impacted by several factors. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of bull and inseminator on the conception rate of females submitted to a FTAI program. For this purpose, it used information from 6.011 female beef cattle of the pluriparous category and mean Body Condition Score of  $2.9 \pm 0.42$ , on a scale of 0 to 5, visually evaluated at the beginning of the FTAI protocol. All animals were kept on pasture with mineral supplementation and water ad libitum. Prior to the beginning of the experiment, the females were submitted to a reproductive evaluation using transrectal ultrasonography with a 5Mhz linear transducer (dp10 Mindray, Shenzhen, China). Only data from animals with no record of reproductive abnormalities were used for analysis. The cows were submitted to a protocol that started on a random day of the estrous cycle, called day zero (D0), with the application of 2mg of Estradiol Benzoate (Gonadiol, Zoetis, São Paulo, Brazil) and the insertion of the Progesterone implant (P4) (CIDR, Zoetis, São Paulo, Brazil) for the first time; on day seven (D7), 12.5mg of dinoprost tromethamine (Lutalyse, Zoetis, São Paulo, Brazil) was administered; on day nine (D9) the P4 implants were removed, 300 I.U. of Equine Chorionic Gonadotropin (eCG, Zoetis, São Paulo, Brazil) and 0.6mg of estradiol cypionate (E.C.P., Zoetis, São Paulo, Brazil). Finally, on day eleven (D11), artificial insemination (AI) was performed by 16 different AI technicians. Marketed cryopreserved semen of 54 Nellore bulls was used. The semen was thawed at a temperature of 37°C for 30 seconds. Conception was diagnosed by means of transrectal ultrasonography, with a 5Mhz linear transducer (dp10 Mindray, Shenzhen, China), 40 days after artificial insemination. It was considered positive pregnancy diagnosis, animals with the presence of a visible embryo with confirmed viability (heartbeat). To assess the interference of the variables of interest, the multivariate analysis of binary logistic regression was used. The inseminator influenced the fertility rates ( $P < 0.05$ ), with a 1.02 fold increase in the conception rate among the 16 AI technicians. With regard to the bull, frozen semen from 57 different Nellore breeders was used, where there was interference on the conception rate ( $P < 0.05$ ), with a 1.00 fold increase in the chances of conception among bulls. The AI technician and the bull influenced the FTAI results, and experienced technicians and bulls with high viability semen should be used during the execution of the technique. Therefore, these factors must be evaluated for the use of FTAI programs, allowing satisfactory results with the execution of this biotechnology.

**Keywords:** *Bos taurus indicus*, bull, conception rate, inseminator.

## Efeito do número de montas falsas sobre a concentração e parâmetros de qualidade do sêmen de touros

Mariana Karla Francolino Silva<sup>1</sup>, Natasha Gonçalves<sup>2</sup>, Marcelo Sant'Ana Borges<sup>3</sup>, Larysse Aparecida Alves<sup>2</sup>,  
Rafael Rocha Paula<sup>2</sup>, Luiz Felipe Canela Souza<sup>2</sup>, André Maciel Crespilha<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo, SP, Brasil

\*e-mail: andre.crespilha@centralbelavista.com.br

Para garantir a maximização do potencial reprodutivo e genético do rebanho bovino, as Centrais de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) devem seguir rigorosos protocolos de qualidade para produção do maior número possível de doses de sêmen, com alto potencial de fertilização. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a possível influência do número de montas falsas, estratégia de manejo implementada na fase pré-coleta, sobre os parâmetros de qualidade seminal e características relacionadas a excitação de touros. O estudo foi conduzido na Central Bela Vista® (Botucatu/SP) a partir da seleção de 20 reprodutores adultos de diferentes raças (Angus [n=2], Holandês [n=3], Jersey [n=3], Brangus [n=2], Nelore [n=6], Girolando [n=2] e Guzerá [n=2]), condicionados para coleta de sêmen em sistema de vagina artificial. Previamente ao início do trabalho todos os touros passaram por pelo menos 4 coletas de sêmen em intervalo de 2 semanas para nivelamento biológico. Para excitação dos reprodutores foram utilizadas vacas mestiças (manequins), em fase aleatória do ciclo estral (fora do período folicular) e que não receberam nenhum tratamento voltado à indução do estro. Todas as coletas de sêmen foram conduzidas no mesmo período (março de 2022) em galpão climatizado, dotado de cobertura e ventilação mecânica. Previamente as coletas cada reprodutor passou de forma aleatória e consecutiva por 3 tipos de manejo, compostos por 0, 2 ou 4 montas falsas (MF = excitação com projeção do corpo sobre a manequim, apoio apenas dos membros posteriores ao solo e desvio peniano realizado pelo profissional responsável pela coleta de sêmen). O intervalo entre cada coleta, de acordo com os 3 tipos de manejo, foi de 3 dias. Cada ejaculado colhido foi submetido a análise de qualidade composta pela avaliação de volume (peso do ejaculado mensurado em balança digital/1,053), concentração (fotômetro Accuread®, IMV, França), motilidade e vigor espermático (20µl de sêmen fresco, diluído em 1,0 ml de meio Optixcell® [IMV, França] para avaliação entre lâmina e laminula em microscopia ótica convencional). Os dados gerados foram submetidos a análise de variância (GLIMMIX®, SAS Institute, USA), considerando como efeito principal o número de falsas montas, além de suas possíveis interações sobre as variáveis de qualidade espermática. A concentração média de espermatozoides por ejaculado foi afetada pela raça (P=0,0007) e salto do touro (primeiro ou segundo do dia; P=0,0006;), não havendo, no entanto, interação com a manifestação de reflexo de Flehmen ou com o tempo de excitação dispendido por cada animal (P>0,05). Maior concentração de espermatozoides foi observada após a realização de 4 montas falsas (802,35<sup>a</sup>×10<sup>6</sup>/ml) em relação a ejaculados obtidos sem a condução das MF na fase pré-coleta (625,9<sup>b</sup>×10<sup>6</sup>/ml; P=0,0263). No entanto, sem diferenças para o sêmen colhido após 2MF (737,2<sup>ab</sup>×10<sup>6</sup>/ml). O número de montas falsas não influenciou o volume dos ejaculados (P=0,3616), motilidade total (P=0,5384) e vigor espermático (P=0,5153) do sêmen fresco. Conclui-se que embora não exerça influência sobre o comportamento sexual na fase pré-coleta, o número de MF exerce influência sobre a concentração espermática, permitindo maximizar o número de espermatozoides e o potencial reprodutivo de touros.

**Palavras-chave:** Bovino, excitação, montas falsas, qualidade, sêmen.

## Effect of the number of false mounts on semen quality parameters of bulls

Mariana Karla Francolino Silva<sup>1</sup>, Natasha Gonçalves<sup>2</sup>, Marcelo Sant'Ana Borges<sup>3</sup>, Larysse Aparecida Alves<sup>2</sup>,  
Rafael Rocha Paula<sup>2</sup>, Luiz Felipe Canela Souza<sup>2</sup>, André Maciel Crespilha<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil

<sup>4</sup>Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo, SP, Brasil

\*e-mail: andre.crespilha@centralbelavista.com.br

To ensure the maximization of the reproductive and genetic potential of the cattle herd, Semen Collection and Processing Centers (CCPS) must follow strict quality protocols to produce the highest possible number of semen doses with a high fertilization potential. In this context, the present study aimed to evaluate the possible influence of the number of false mounts, a management strategy implemented in the pre-collection phase, on seminal quality parameters and characteristics related to bull arousal. The study was conducted at the Central Bela Vista® (Botucatu/SP) from the selection of 20 adult bulls from different breeds (Angus [n=2], Holstein [n=3], Jersey [n=3], Brangus [n=2], Nelore [n=6], Girolando [n=2], and Guzerá [n=2]), conditioned for semen collection using artificial vagina. Prior to the start of the experiment, all bulls underwent at least 4 semen collections at a 2-week interval for biological leveling. For sexual stimulation were used crossbred cows (mannequins) in a random phase of the estrous cycle (not on follicular period) and that did not receive any treatment aimed at inducing estrus. All semen collections were conducted in the same period (march 2022) in a climatized shed, equipped with a cover and mechanical ventilation. Prior to the collections, each bull underwent, randomly and consecutively, for 3 types of management, composed of 0, 2, or 4 false mounts (FM = arousal with body projection onto the mannequin, support only on the hind limbs on the ground, and penile deviation performed by the professional responsible for semen collection). The interval between each collection, according to the 3 types of management, was 3 days. Each ejaculate collected was subjected to a quality analysis composed of volume evaluation (ejaculate weight measured on a digital scale/1.053), concentration (Accureed® photometer, IMV, France), sperm motility, and vigor (20µl of fresh semen diluted in 1.0 ml of Optixcell® [IMV, France] for evaluation between slide and cover slip in conventional optical microscopy). The generated data were subjected to analysis of variance (GLIMMIX®, SAS Institute, USA), considering as the main effect the number of false mounts, in addition to their possible interactions on sperm quality variables. The mean concentration of sperm per ejaculate was affected by breed (P=0.0007) and bull jump (first or second of the day; P=0.0006), with no interaction with the manifestation of flehmen reflex or with the time of arousal expended by each animal (P>0.05). Higher sperm concentration was observed after the performance of 4 false mounts ( $802.35^a \times 10^6/\text{ml}$ ) compared to ejaculates obtained without conducting the FM in the pre-collection phase ( $625.9^b \times 10^6/\text{ml}$ ; P=0.0263). However, with no differences for semen collected after 2FM ( $737.2^{ab} \times 10^6/\text{ml}$ ). The number of false mounts did not influence ejaculate volume (P=0.3616), total motility (P=0.5384) and sperm vigor (P=0.5153) of fresh semen. It is concluded that although it does not influence on sexual behavior in the pre-collection phase, the number of FM exerts influence on sperm concentration, allowing for the maximization of the number of sperm and the reproductive potential of bulls.

**Keywords:** Bull, false mounts, quality, semen, sexual stimulation.

## Homogeneização de amostras de sêmen bovino por agitação em vortex

Rochelle Stefanny Maurante Soares<sup>1,2\*</sup>, Rafaela Dalmolin Menezes<sup>2</sup>, Diogo Ferreira Bicca<sup>2</sup>, Francielli Weber Santos Cibir<sup>2</sup>, Fabio Gallas Leivas<sup>2</sup>, Daniela dos Santos Brum<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Educação Tutorial: PET- Veterinária, Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução-BIOTECH, Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA  
Uruguaiana, RS

\*e-mail: rochellesoares.aluno@unipampa.edu.br

A utilização de análises laboratoriais na andrologia veterinária tem aumentado consideravelmente com o objetivo de identificar técnicas de avaliação espermática que apresentem maior correlação com a fertilidade no campo. Nesse contexto, a preparação adequada da amostra é essencial, uma vez que ela deve ser representativa de um ejaculado bovino que contém cerca de 5 bilhões de células ou de palhetas com cerca de 20 milhões de espermatozoides (sptz). O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do método de homogeneização por meio do vortex em amostras de sêmen bovino. Foram realizadas quatro repetições com pool de sêmen de dois touros aprovados para reprodução. As palhetas foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e avaliadas quanto à motilidade, vigor e concentração espermática. Em seguida, o sêmen foi selecionado por meio de gradientes de Percoll (90% e 45%), e o pellet resultante foi avaliado novamente em relação às características espermáticas. Para compor os diferentes tratamentos, utilizou-se uma concentração de 4 milhões de sptz/mL em tubos contendo 350 µL de meio Fert TALP. Após um período de incubação de uma hora a 37°C, a amostra foi homogeneizada para formar os tratamentos: P3 homogeneizado com três pipetagens (P200 µL), P6 homogeneizado com seis pipetagens (P200 µL), V3 homogeneizado em vortex por três segundos e V6 homogeneizado em vortex por seis segundos. Imediatamente após a homogeneização, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e número de células em três campos avaliados no CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Foram armazenadas amostras para avaliação bioquímica de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), por método fluorimétrico, e a capacidade oxidante total, determinada pelo método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os tratamentos P3, P6, V3 e V6 apresentaram resultados semelhantes entre si nos parâmetros cinéticos ( $P > 0,05$ ). Para a motilidade total (MT), os valores obtidos foram de 57, 50, 62 e 59 (%), para a motilidade progressiva (MP), os valores foram de 21; 26; 38 e 37 (%), e para o número de células por campo, foram obtidos valores de 57, 60, 68 e 46. Os parâmetros bioquímicos também foram semelhantes entre si ( $P > 0,05$ ), sendo as unidades de fluorescência-UF de ERO de 12,87; 6,41; 6,22; 5,94 e as quantidades equivalentes de ácido ascórbico (µg Eq. AA) de FRAP de 159,5; 132,5; 146 e 142,5, respectivamente. Com base nos resultados, conclui-se que a utilização do vortex foi eficiente na homogeneização de amostras de sêmen bovino para os parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** Espermatozoide, bovinocultura, cinética espermática, homogeneização.

**Agradecimentos:** Programa de Educação Tutorial- PET, CAPES, FINEP.

## Homogenization of bovine semen samples by vortex method

Rochelle Stefanny Maurante Soares<sup>1,2\*</sup>, Rafaela Dalmolin Menezes<sup>2</sup>, Diogo Ferreira Bicca<sup>2</sup>, Francieli Weber Santos Cibirin<sup>2</sup>, Fabio Gallas Leivas<sup>2</sup>, Daniela dos Santos Brum<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Educação Tutorial: PET- Veterinária, Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA

<sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução-BIOTECH, Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA  
Uruguaiana, RS

\*e-mail: rochellesoares.aluno@unipampa.edu.br

The use of laboratory analyses in veterinary andrology has significantly increased in recent years to identify sperm evaluation techniques that show a higher correlation with fertility in the field. Proper sample preparation is crucial to ensure that the sample is representative of a bovine ejaculate containing about 5 billion cells or straws containing about 20 million spermatozoa (sptz). The objective of this study was to evaluate the efficacy of the vortex homogenization method in bovine semen samples. Four repetitions were conducted using semen pools from two bulls approved for reproduction. Semen straws were thawed at 37°C for 30 seconds and evaluated for motility, vigor, and sperm concentration. Subsequently, the semen was selected through Percoll gradients (90% and 45%), and the resulting pellet was re-evaluated for sperm characteristics. A concentration of 4 million sptz/mL in tubes containing 350 µL of Fert TALP medium was used to compose the different treatments. After an incubation period of one hour at 37°C, the sample was divided in four treatment groups: P3 homogenized with three pipettings (P200 µL), P6 homogenized with six pipettings (P200 µL), V3 homogenized in a vortex for three seconds, and V6 homogenized in a vortex for six seconds. Immediately after homogenization, samples were evaluated for total motility (TM), progressive motility (PM), and the number of cells in three fields evaluated in the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system. Samples were stored for biochemical evaluation of Reactive Oxygen Species (ROS) by a fluorimetric method, and total antioxidant capacity determined by the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) method. The data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA), and means were compared by the Tukey test, with a significance level of 5%. The P3, P6, V3, and V6 treatments presented similar results for the kinetic parameters ( $P>0.05$ ). For total motility (TM), values obtained were 57, 50, 62, and 59 (%), for progressive motility (PM), values were 21, 26, 38, and 37 (%), and for the number of cells per field, values of 57, 60, 68, and 46 were obtained. The biochemical parameters were also similar to each other ( $P>0.05$ ), with ROS fluorescence units (UF) of 12.87, 6.41, 6.22, and 5.94 and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) equivalents of 159.5, 132.5, 146, and 142.5 µg Eq. AA, respectively. Overall, our findings suggest that the use of the vortex homogenization was efficient in homogenizing bovine semen samples for the evaluated parameters.

**Keywords:** spermatozoa, cattle farm, sperm kinetics, homogenization.

**Acknowledgment:** Tutorial Education Program - PET, CAPES, FINEP.



## Influência das espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio em espermatozoides bovinos criopreservados sobre os índices de fertilidade na IATF

Shirley Andrea Florez Rodriguez<sup>1</sup>, Felipe Barbosa dos Santos<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Maíra Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Flávia dos Santos Almeida<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>3</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

\*e-mail: celeghin@usp.br

A produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) e ao nitrogênio (RNS) apresenta importante função na modulação da fertilidade *in vivo*, já que baixas concentrações de ROS e RNS são necessárias para promover a oxidação do colesterol e a fosforilação de tirosina, eventos que sustentam a capacitação espermática. No entanto, a superprodução destas espécies reativas pode levar a um estado de estresse oxidativo que compromete a função espermática. O estresse oxidativo tem sido determinado como o principal causador de danos nas membranas espermáticas e no DNA. Acredita-se que os espermatozoides lesados geram mais ROS. Fatos que evidenciam que ainda há muito a pesquisar sobre o papel dos mecanismos oxidativos e a influência na fertilidade. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar se o metabolismo oxidativo espermático é um fator chave para detectar as diferenças entre partidas de sêmen com alto e baixo escore de fertilidade após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram utilizadas 18 partidas de sêmen de seis touros da raça Aberdeen Angus, sendo 3 partidas de touro de alto escore de fertilidade (AF, n=9), e 3 partidas de touro de baixo escore de fertilidade (BF, n=9). O escore de fertilidade foi determinado com base na média da taxa de prenhez após IATF (AF de 29.939 IA em 286 rebanhos e BF de 3.259 IA em 23 rebanhos). Duas palhetas do sêmen da mesma partida foram descongeladas (37°C/30 seg) e seu conteúdo homogeneizado e avaliado quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal (FITC-PNA+PI+SYTO-59), potencial de membrana mitocondrial (JC-1+PI+SYTO-59), produção de ânion superóxido mitocondrial espermático (Mitosox Red+YOPRO-1+SYTO-59), presença de espécies reativas ao oxigênio citoplasmáticas (Dihidroetidium-DHE+YOPRO-1+SYTO-59), peroxidação lipídica (C<sub>11</sub>-BODIPY+PI+SYTO-59), detecção de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) e derivados (Dihidrorodamina-DHR+SYTO-59+PI) e detecção do óxido nítrico (NO, 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato-DAF-2/DA+PI+SYTO-59). Todas as análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD Acurri™ (BD Biosciences, São José, CA, EUA). A média da taxa de prenhez foi diferente (P<0,05) entre os grupos AF (56,25±1,91%) e BF (45,6±8,47%). Notou-se que a produção de óxido nítrico foi maior (P=0,0147) para a AF (5230,5 ± 434,56 ua) do que para BF (3480,28 ± 434,56 ua) e foi obtida correlação positiva do óxido nítrico com a fertilidade (r = 0.57, p= 0.014). Nenhuma outra característica espermática apresentou diferença (P>0,05) entre os grupos. Estes resultados confirmam a relação do óxido nítrico com os eventos da fertilidade, mas mais estudos são necessários para melhorar a compreensão da relação dos processos oxidativos/antioxidantes.

**Palavras-chaves:** Sêmen, Touro, Óxido nítrico, ROS, RNS

**Agradecimentos:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2018/25938-5) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 312510/2021-7).

## Influence of reactive oxygen and nitrogen species in cryopreserved bovine spermatozoa on fertility rates at IATF

Shirley Andrea Florez Rodriguez<sup>1</sup>, Felipe Barbosa dos Santos<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Maíra Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Flávia dos Santos Almeida<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, Mariana Andrade Torres<sup>3</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil. <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil. <sup>3</sup>Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Pirassununga, São Paulo, Brasil  
\*e-mail: celeghin@usp.br

The production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen species (RNS) plays a vital role in modulating fertility *in vivo*. Low concentrations of ROS and RNS are necessary to promote cholesterol oxidation and tyrosine phosphorylation, which are events that support sperm capacitation. However, the overproduction of these reactive species can lead to a state of oxidative stress that compromises sperm function. Oxidative stress has been identified as the primary cause of damage to sperm membranes and DNA. Damaged sperm are thought to generate more ROS. These facts highlight the need for further research on the role of oxidative mechanisms and their influence on fertility. Therefore, the objective of this study was to determine if sperm oxidative metabolism is a key factor in detecting differences between semen samples with high and low fertility scores after fixed-time artificial insemination (FTAI). For this study, eighteen semen samples were collected from six Aberdeen Angus bulls, with each group containing three samples from bulls with high fertility scores (HF, n=9) and three samples from bulls with low fertility scores (LF, n=9). Fertility score was determined based on the average pregnancy rate after FTAI, with an average fertility score of 29,939 AI in 286 herds for the high fertility group and 3,259 AI in 23 herds for the low fertility group. Two semen straws from the same batch were thawed at 37°C for 30 seconds, the content has been homogenized, and evaluated for plasma and acrosomal membrane integrity using FITC-PNA+PI+SYTO59 fluorescent probes. Additionally, mitochondrial membrane potential was assessed using JC-1+PI+SYTO59 staining, while sperm mitochondrial superoxide anion production was evaluated using Mitosox Red+YOPRO-1+SYTO59 staining. The presence of cytoplasmic reactive oxygen species was detected using Dihydroethidium-DHE+YOPRO-1+SYTO59 staining, while lipid peroxidation was measured using C11-BODIPY+PI+SYTO59 staining. The detection of peroxynitrite and its derivatives was carried out using Dihydrorodamine-DHR+SYTO59+PI staining, and nitric oxide (NO) was detected using 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate-DAF-2/DA+PI+SYTO59 staining. All analyses were performed using the BD Acurri™ flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The mean pregnancy rate was significantly different ( $P < 0.05$ ) between the AF group ( $56.25 \pm 1.91\%$ ) and the BF group ( $45.6 \pm 8.47\%$ ). Nitric oxide production was observed to be higher ( $P = 0.0147$ ) in the AF group ( $5230.5 \pm 434.56$  ua) than in the BF group ( $3480.28 \pm 434.56$  ua), and a positive correlation between nitric oxide and fertility was found ( $r = 0.57$ ,  $p = 0.014$ ). No other significant differences ( $P > 0.05$ ) in sperm characteristics were observed between the groups. These results confirm the relationship between nitric oxide and fertility, but further studies are required to improve the understanding of the relationship between oxidative/antioxidant processes and fertility.

**Keywords:** Semen, Bull, Nitric oxide, ROS, RNS

**Acknowledgments:** To São Paulo Research Foundation (FAPESP, process 2018/25938-5) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process 312510/2021-7).

## Medidas biométricas testiculares de touros nelores sexualmente maduros associadas a índices de DEP genômica de idade ao primeiro parto

Artur Azevedo Menezes<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Sousa<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>2</sup>, Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>2</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>1</sup>, Hugo Cartibani Miranda Cruz<sup>3</sup> Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>2</sup>Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia – HospMev/UFBA; <sup>3</sup>Médico veterinário autônomo <sup>4</sup>Professor da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA  
\*e-mail: arturmenezes@ufba.edu.br

O setor agropecuário tem participação importante no Produto Interno Bruto (PIB) nacional, e a pecuária de corte, por sua vez, vem demonstrando um crescimento consolidado ano a ano. Cabe ressaltar que esse crescimento foi acompanhado por um aumento na produtividade, ou seja, quilos de carne produzida por hectare por ano associado a involução na ocupação da área de pastagem destinada à atividade. Os números registrados nos últimos anos são frutos de um trabalho contínuo de melhoria na tríade sanidade, nutrição e, em especial, do melhoramento genético. Dessa forma, a Diferença Esperada na Progênie (DEP) e a DEP genômica (DEPG) representam importantes tecnologias para avaliação e identificação de animais superiores. Tais métodos permitem realizar uma estimativa da diferença genética esperada entre a progênie de um touro e a média da população. Nesse contexto, as características reprodutivas vêm se destacando nos programas de melhoramento genético, pois fertilidade e precocidade sexual são componentes importantes no aumento da produtividade. A idade ao primeiro parto de novilhas influencia diretamente no desempenho reprodutivo do rebanho, uma vez que novilhas que tem a Idade ao Primeiro Parto (IPP) reduzida possuem uma vida produtiva maior, produzem mais bezerras, reduzem os custos com a cria e aumentam a receita da atividade. Assim, o objetivo do presente trabalho é apresentar a correlação entre parâmetros biométricos testiculares (Perímetro escrotal - PE) de touros nelores sexualmente maduros, destinados a comercialização como reprodutores, e sua associação com índices de DEPG para IPP. Para isso foram utilizados dados de exames andrológicos, realizados em fase de pré-comercialização, de 72 touros genotipados com idades entre 21 e 25 meses, localizados em uma propriedade na região do triângulo mineiro e do alto paranaíba do estado de Minas Gerais. Os valores de PE foram obtidos por meio de avaliação com fita métrica apropriada, graduada em milímetros, posicionada na região de maior perímetro da bolsa testicular, conforme orientação do CBRA (2013). Os dados de DEPG foram coletados a partir de dados públicos do programa de melhoramento ANCP. Os dados obtidos foram submetidos a teste estatísticos de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, sendo os dados paramétricos correlacionados pelo teste de Pearson. Foi observada uma média e desvio padrão de, respectivamente,  $38,7 \pm 2,43$  cm para a característica de PE e uma média e desvio padrão de, respectivamente,  $-17,8 \pm 8,35$  para o índice de Idade ao Primeiro Parto. Não foi encontrada correlações entre PE e IPP ( $p > 0,05$ ). Esse resultado vai de encontro a dados da literatura, que citam correlação significativas entre dados biométricos dos testículos e características reprodutivas das fêmeas. Esse achado pode ser justificado pelo fato de as aferições biométricas terem sido realizadas após a fase de puberdade dos animais, momento esse, em que já ocorreu o pico de crescimento testicular, reduzindo, assim, a possibilidade de correlacionar o PE com a DEPG de IPP. Além disso, um outro fator que pode ter influenciado o resultado do presente estudo é o fato do uso apenas da DEPG, sendo essa marcada por apresentarem baixa acurácia, além da possibilidade de ocorrer mudanças nesses valores em possíveis avaliações futuras. Desta forma, conclui-se que não é possível estimar tendências nas taxas de herdabilidade para a característica de DEPG de IPP por meio da avaliação biométrica dos testículos de touros sexualmente maduros.

**Palavras-chave:** DEP Genômica, IPP, Perímetro Escrotal.

## Testicular biometric measurements of sexually mature nellore bulls associated with age at first calving genomic EPD index

Artur Azevedo Menezes<sup>\*1</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Sousa<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>2</sup>, Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>2</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>1</sup>, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>2</sup>Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia – HospMev/UFBA; <sup>3</sup>Professor da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA

\*e-mail: arturmenezes@ufba.edu.br

The agricultural sector has an important share in the national Gross Domestic Product, and beef cattle, in turn, has been showing consolidated growth year after year. It should be noted that this growth was accompanied by an increase in productivity, that is, kilograms of meat produced per hectare per year associated with the involution in the occupation of the pasture area destined for the activity. The numbers recorded in recent years are the result of continuous work to improve the triad of health, nutrition and genetic improvement. Thus, the Expected Progeny Difference (EPD) and the genomic EPD (EPDG) represent important technologies for the evaluation and identification of superior animals. Such methods allow estimating the expected genetic difference between the progeny of a bull and the population mean. In this context, reproductive traits have been highlighted in genetic improvement programs, as fertility and sexual precocity are important components in increasing productivity. The age at first calving of heifers directly influences the reproductive performance of the herd, since heifers that have a reduced Age at First Calving (AFC) have a longer productive life, produce more calves, reduce rearing costs and increase revenue of the activity. Thus, the objective of this study is to present the correlation between testicular biometric parameters (scrotal circumference - SC) of sexually mature Nellore bulls, intended for commercialization as sires, and their association with EPDG indexes for AFC. For this purpose, data from andrological examinations, carried out in the pre-marketing phase, of 72 genotyped bulls aged between 21 and 25 months, located on a property in the region of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba in the state of Minas Gerais, were used. The SP values were obtained by means of an evaluation with an appropriate measuring tape, graduated in millimeters, positioned in the region with the greatest perimeter of the testicular sac, as per the guidelines of the CBRA (2013). EPDG data were collected from public data from the ANCP breeding program. The data obtained were submitted to statistical tests of normality by the Shapiro-Wilk method, and the parametric data correlated by the Pearson test. A mean and standard deviation of, respectively,  $38.7 \pm 2.43$  cm was observed for the SC characteristic and a mean and standard deviation of, respectively,  $-17.8 \pm 8.35$  for the Age at First Childbirth index. No correlations were found between SC and AFC ( $p > 0.05$ ). This result is in line with literature data, which cite significant correlations between testicular biometric data and reproductive characteristics of females. This finding can be justified by the fact that the biometric measurements were performed after the animals' puberty phase, when the peak of testicular growth had already occurred, thus reducing the possibility of correlating SC with AFC EPDG. In addition, another factor that may have influenced the result of the present study is the fact that only EPDG was used, which is characterized by having low accuracy, in addition to the possibility of changes in these values in possible future evaluations. Thus, it is concluded that it is not possible to estimate trends in the heritability rates for the EPDG trait of AFC through the biometric evaluation of the testes of sexually mature bulls.

**Keywords:** Genomic DEP, AFC, Scrotal Perimeter.

## Perfil do exame andrológico de touros mantidos na Prova de Avaliação de Desempenho (PADs)

Juliana Corrêa Borges Silva<sup>1,2\*</sup>, Ériklis Nogueira<sup>1,2</sup>, Alessandra Corallo Nicacio<sup>2</sup>, Ana Paula Silveiro Leite<sup>2</sup>, Amanda Alves Rosa Taveira<sup>2</sup>, Roberto Augusto de Almeida Torres Junior<sup>2</sup>, Rodrigo da Costa Gomes<sup>2</sup>, Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, CPAP, Corumbá, MS, Brasil, <sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, CPNGC, Campo Grande, MS, Brasil  
\*e-mail: juliana.correa@embrapa.br

Identificar touros que possuam melhor conversão alimentar, ou seja, convertem mais e melhor o alimento que ingerem em ganho de peso, é essencial para aumento de produtividade. Assim, a Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS, realiza anualmente a Prova de Avaliação de Desempenho (PADs), onde touros bem avaliados geneticamente pelo programa EMBRAPA-GENEPLUS, permanecem em confinamento sob as mesmas condições alimentares, por um período de 77 dias (21 dias para adaptação e 56 dias de prova). Os animais são mantidos em baias coletivas, onde é realizado controle individual e informatizado de consumo alimentar e ganho de peso (Intergado®). São realizados ao final da prova, ultrassonografia de carcaça e o exame andrológico desses indivíduos, com a idade média de 22 meses. Assim, durante as provas 2021 e 2022 avaliou-se o perfil do exame andrológico dos touros, que serão descritos a seguir. Foram avaliados 238 animais, 138 touros em 2021 (108 Nelore e 30 Brangus), e 100 touros Nelore em 2022. Desse total, seis touros Nelore (três em cada ano de prova) tiveram problema com a coleta (presença de poucas células espermáticas ou não ejacularam) e por isso a média dos exames andrológicos totalizou 232 animais. O peso médio foi de 603 Kg Nelore (466 a 790kg) e 583 kg Brangus (435 a 700kg), mínimo e máximo, respectivamente. A média geral dos exames andrológicos de 2021 foram PE= 35 cm, motilidade progressiva= 68%, vigor espermático= 3, volume= 4 mL, defeitos maiores= 8,7%, defeitos menores= 6,9%. A média da prova de 2021, dos touros Nelore e Brangus, respectivamente, com os valores mínimo e máximo, foram: PE= 34,4 cm (25 a 41 cm) e 38 cm (31 a 45 cm), motilidade progressiva= 67% (10% a 80%) e 71% (40% a 80%), vigor espermático= 3 (2 a 4, em ambas as raças), defeitos maiores= 7,7% (1% a 54%) e 12,6% (1% a 50%), defeitos menores= 6,0 (0% a 30%) e 10% (3% a 35%). A média da prova do ano de 2022, dos 100 touros Nelore, com os valores mínimo e máximo, foram: peso= 585kg (451 a 760 kg), PE= 36 cm (30 a 42,5 cm), motilidade progressiva= 66% (20% a 80%), vigor espermático= 3 (2 a 4), volume= 4,2 mL (2 a 12 mL), defeitos maiores= 9% (2% a 46%), defeitos menores= 7,3% (0% a 22%). Avaliando a média, e valores mínimo e máximo, para as patologias espermáticas em ambas as provas tivemos: acrossoma= 0,46% (0 a 10%), gota citoplasmática proximal = 3,0% (0 a 56%), subdesenvolvido= 0,19% (0 a 3%), cauda enrolada na cabeça= 0,33% (0 a 7%), cabeça isolada anormal= 0,08% (0 a 3%), estreito na base= 0,05% (0 a 2%), piriforme= 0,12% (0 a 3), contorno anormal= 0,02% (0 a 2), *pouch formation*= 0,02% (0 a 2), formas teratológicas= 0,19% (0 a 4%), cauda fortemente dobrada= 3,59% (0 a 44%), cauda dobrada com gota= 0,79% (0 a 40%), defeitos maiores= 8,9% (1 a 54%), delgado= 0,93% (0 a 11%), curto/largo/gigante= 0,05% (0 a 5%), cabeça isolada normal= 2,01% (0 a 30%), abaxial= 0,42% (0 a 6%), cauda dobrada ou enrolada= 1,49% (0 a 11%), gota citoplasmática distal= 2,19% (0 a 26%), defeitos menores= 7,09% (0 a 35%). A avaliação de ambas as provas, totalizaram 86,64% (125+76/232) touros aptos e 13,36% (10+21/232) inaptos temporário. Touros classificados como inapto temporário apresentaram altos índices das patologias a seguir: gota citoplasmática proximal (11%), cauda fortemente dobrada ou enrolada (6,03%), cauda dobrada com gota (4%), cabeça isolada normal (3,4%), cauda dobrada ou enrolada (1,18%) e gota citoplasmática distal (4,9%), e não diferiram quanto ao PE e ao peso dos touros que foram classificados como aptos.

**Palavras-chave:** Defeitos espermáticos; Morfologia espermática; Nelore; Sêmen; Reprodutores.

## Profile of the andrological examination of bulls in the performance and feed efficiency tests

**Juliana Corrêa Borges Silva<sup>1,2\*</sup>, Ériklis Nogueira<sup>1,2</sup>, Alessandra Corallo Nicacio<sup>2</sup>, Ana Paula Silveiro Leite<sup>2</sup>, Amanda Alves Rosa Taveira<sup>2</sup>, Roberto Augusto de Almeida Torres Junior<sup>2</sup>, Rodrigo da Costa Gomes<sup>2</sup>, Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, CPAP, Corumbá, MS, Brasil, <sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, CPNGC, Campo Grande, MS, Brasil  
\*e-mail: juliana.correa@embrapa.br

Identifying bulls with better feed conversion, they eat less and convert to more weight gain, is very important to increase productivity. Thus, Embrapa Beef Cattle, Campo Grande - MS, has carried out annual performance and feed efficiency tests, where the best bulls genetically evaluated by EMBRAPA-GENEPLUS program, are kept for 77 days (21 days of adaptation period, plus 56 days of test) in stalls that have digital and individual control (Intergado®) for measuring food consumption and evaluating weight gain. At the end of the tests, carcass ultrasound and the breeding soundness examination of these individuals, with an average age of 22 months, are carried out. Then, two tests, years 2021 and 2022, evaluated the profile of the breeding soundness examination of the bulls, described below. A total of 238 animals were evaluated, 138 bulls in 2021 (108 Nellore and 30 Brangus), and 100 Nellore bulls in 2022. This total, six Nellore bulls (three in each year) had a problem with the collection (presence of few sperm or no ejaculation) and therefore, the average the andrological exams totaled 232 animals. The average weight was 603 Kg Nellore (466 to 790kg) and 583 kg Brangus (435 to 700kg), minimum and maximum, respectively. The general average in 2021 andrological exams were CE= 35 cm, progressive motility= 68%, sperm vigor= 3, volume= 4 mL, major defects= 8.7%, minor defects= 6.9%. The average in 2021 test, Nellore and Brangus bulls, respectively, with the minimum and maximum values, were: CE = 34.4 cm (25 to 41 cm) and 38 cm (31 to 45 cm), progressive motility = 67 % (10% to 80%) and 71% (40% to 80%), sperm vigor= 3 (2 to 4, in both breeds), major defects= 7.7% (1% to 54%) and 12 .6% (1% to 50%), minor defects= 6.0 (0% to 30%) and 10% (3% to 35%). The average in 2022 test, 100 Nellore bulls, with the minimum and maximum values, were: weight= 585kg (451 to 760 kg), CE= 36 cm (30 to 42.5 cm), progressive motility= 66 % (20% to 80%), sperm vigor= 3 (2 to 4), volume= 4.2 mL (2 to 12 mL), major defects= 9% (2% to 46%), minor defects= 7.3% (0% to 22%). Evaluating the mean, and minimum and maximum values, for sperm pathologies in both tests, we had: acrossome= 0.46% (0 to 10%), proximal cytoplasmic drop = 3.0% (0 to 56%), underdeveloped= 0.19% (0 to 3%), tail curled overhead= 0.33% (0 to 7%), abnormal isolated head= 0.08% (0 to 3%), narrow at base= 0.05% (0 to 2%), piriform = 0.12% (0 to 3), abnormal contour = 0.02% (0 to 2), pouch formation = 0.02% (0 to 2), teratological forms = 0.19% (0 to 4%), heavily bent tail= 3.59% (0 to 44%), bent tail with drop= 0.79% (0 to 40%), major defects= 8.9% (1 to 54%), slender= 0.93% (0 to 11%), short/large/giant= 0.05% (0 to 5%), normal isolated head= 2.01% (0 to 30%), abaxial = 0.42% (0 to 6%), folded or curled tail = 1.49% (0 to 11%), distal cytoplasmic droplet = 2.19% (0 to 26%), minor defects = 7.09% (0 to 35%), total defects 15.9% (3 to 66%). The evaluation of both tests showed 86.64% (125+76/232) apt bulls and 13.36% (10+21/232) temporary unapt. Bulls classified as temporarily unapt presented high rates of the following pathologies: proximal cytoplasmic drop (11%), strongly bent or coiled tail (6.03%), tail folded with drop (4%), normal isolated head (3.4%), folded or coiled tail (1.18%) and distal cytoplasmic drop (4.9%) and did not differ PE, and weight.

**Keywords:** Breeding bulls; Nellore; Semen; Sperm defects, Sperm morphology.



## Perímetro escrotal de touros Nelores em idade reprodutiva associado a índices de DEP genômica de stayability

Eduardo de Oliveira Costa<sup>\*1</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>1</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>1</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>1</sup>, Maíra Planzo Fernandes<sup>1</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>1</sup> Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>2</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>2</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>2</sup>, Hugo Cartibani Miranda Cruz<sup>2</sup>; Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>4</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>2</sup>Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia – HospMev/UFBA; <sup>3</sup>Médico Veterinário do Setor privado; <sup>4</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA  
\*e-mail: m.v.eduardo@outlook.com

A Diferença Esperada na Progênie (DEP) representa uma importante ferramenta de avaliação e identificação de reprodutores, sendo amplamente utilizada na bovinocultura visando o melhoramento genético de um rebanho. Tal método permite selecionar animais geneticamente superiores para características desejadas e com maior potencial de transmiti-las para seus descendentes. Com o advento do uso de marcadores moleculares e avaliação de DNA dos animais, se tornou possível estimar a DEP genômica (DEPG). Essa nova ferramenta permite identificar variações genéticas específicas associadas a características de interesse, que, quando associada a informações de pedigree, desempenho próprio e da progênie, fornece valores de DEP ainda mais precisos e com maior acurácia, sendo possível ainda estimar tais valores de candidatos jovens a reprodução que ainda não possuem descendentes. O Stayability é uma das características que podem ser estimadas pela DEP e DEPG, é expressa em porcentagem e mede a habilidade das fêmeas, filhas de determinado reprodutor, permanecerem no rebanho por no mínimo 76 meses, produzindo ao menos 3 produtos, sendo um indicativo de sua longevidade e lucratividade reprodutiva e de menores taxas de reposição. Durante o exame andrológico dos animais de produção, uma das mais importantes características a serem avaliadas são as biometrias testiculares, podendo serem representadas pelo perímetro escrotal (PE) e pelas medidas de comprimento, largura e espessura. O PE é uma medida amplamente utilizada nos programas de melhoramento de bovinos, devido a sua alta correlação com a concentração e qualidade da produção espermática, podendo ainda ser um indicador de precocidade sexual (Stafuza, et al., 2019). O objetivo desse resumo é apresentar a correlação entre parâmetros de PE de touros nelores em idade reprodutiva, destinados a comercialização como reprodutores, e sua associação com índices de DEPG para Stayability. Para isso foram utilizados dados de exames andrológicos, realizados em fase de pré-comercialização, de 72 touros genotipados com idades entre 21 e 25 meses, localizados em uma propriedade na região do triângulo mineiro e do alto paranaíba do estado de Minas Gerais. Os valores de PE foram obtidos por meio de avaliação com fita métrica apropriada, graduada em milímetros, posicionada na região de maior perímetro da bolsa escrotal, conforme orientação do CBRA (2013). Os dados de DEPG foram coletados a partir de dados públicos do programa de melhoramento ANCP. Os dados para PE não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk), desta forma sendo feita a correlação das medidas pelo teste de Spearman. Foi observada uma média de  $38,7 \pm 2,43$  cm com mediana de 38,5 cm para a característica de PE e uma média de  $78,9 \pm 7,14$  meses para o índice de Stayability. Não foi encontrada correlações significativas entre PE e Stayability ( $p > 0,05$ ), tal resultado vai contra aos dados amplamente disseminados na literatura, que citam correlação significativas entre dados biométricos dos testículos e características reprodutivas das fêmeas (Silva Neto, et al., 2020, Siqueira et al., 2013, Thrift e Thrift, 2006). Esse resultado pode ser justificado pelo fato de que as aferições biométricas utilizadas ocorreram após a fase de puberdade dos animais, momento em que já houve o pico de crescimento testicular, tendendo a estabilização, o que torna menos possível estimar características de precocidade sexual do animal e/ou de sua prole. Outro fator também pode ter colaborado para o resultado encontrado é do fato das DEPG serem de origem apenas genômicas e de animais que ainda não tiveram prole avaliada, o que por consequência gera dados de DEPG com baixa acurácia. Desta forma, conclui-se que não é possível estimar tendências nas taxas de herdabilidade para a característica de DEPG de Stayability por meio da avaliação de PE de touros na faixa de idade apresentada no estudo.

**Palavras-chave:** DEP Genômica, Habilidade de Permanência, Perímetro Escrotal.

## Scrotal circumference of Nelore bulls at reproductive age associated with stayability genomic EPD index

Eduardo de Oliveira Costa<sup>\*1</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>1</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>1</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>1</sup>, Maíra Planzo Fernandes<sup>1</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>1</sup> Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>2</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>2</sup>, Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>2</sup>, Hugo Cartibani Miranda Cruz<sup>2</sup>; Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>4</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>2</sup>Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia – HospMev/UFBA; <sup>3</sup>Médico Veterinário do Setor privado; <sup>4</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA  
\*e-mail: m.v.eduardo@outlook

The Expected Progeny Difference (EPD) represents an important tool for the evaluation and identification of sires, being widely used in cattle breeding aiming at the genetic improvement of a herd. This method allows selecting genetically superior animals for desired traits and with greater potential to transmit them to their offspring. With the advent of the use of molecular markers and evaluation of animal DNA, it has become possible to estimate genomic EPD (EPDG). This new tool allows identifying specific genetic variations associated with traits of interest, which, when associated with pedigree information, own and progeny performance, provides even more precise and more accurate EPD values, making it possible to estimate such values for young candidates. reproduction that does not yet have offspring. Stayability is one of the characteristics that can be estimated by EPD and EPDG, it is expressed in percentage and measures the ability of females, daughters of a given sire, to remain in the herd for at least 76 months, producing at least 3 products, being an indication of their longevity and reproductive profitability and lower replacement rates. During the andrological examination of production animals, one of the most important characteristics to be evaluated is the testicular biometrics, which can be represented by the Scrotal circumference (SC) and by measurements of length, width and thickness. SC is a widely used measure in cattle breeding programs, due to its high correlation with the concentration and quality of sperm production, and may also be an indicator of sexual precocity (Stafuza, et al., 2019). The objective of this summary is to present the correlation between SC parameters of Nelore bulls at reproductive age, intended for commercialization as sires, and their association with EPDG indices for Stayability. For this purpose, data from andrological examinations, carried out in the pre-marketing phase, of 72 genotyped bulls aged between 21 and 25 months, located on a property in the region of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba in the state of Minas Gerais, were used. SC values were obtained by means of an evaluation with an appropriate measuring tape, graduated in millimeters, positioned in the region with the greatest perimeter of the scrotum, as per the guidelines of the CBRA (2013). EPDG data were collected from public data from the ANCP breeding program. Data for SC did not show normal distribution (Shapiro-Wilk test), so the correlation of measurements was performed using Spearman's test. An average of  $38.7 \pm 2.43$  cm was observed with a median of 38.5 cm for the SC characteristic and an average of  $78.9 \pm 7.14$  months for the Stayability index. No significant correlations were found between SC and Stayability ( $p > 0.05$ ), this result goes against data widely disseminated in the literature, which cite significant correlations between biometric data of the testes and reproductive characteristics of females (Silva Neto, et al., 2020, Siqueira et al., 2013, Thrift and Thrift, 2006). This result can be justified by the fact that the biometric measurements used took place after the animals' puberty, when there was already a peak of testicular growth, tending to stabilization, which makes it less possible to estimate characteristics of the animal's sexual precocity and /or their offspring. Another factor that may also have contributed to the result found is the fact that the EPDG are of genomic origin only and from animals that have not yet had offspring evaluated, which consequently generates EPDG data with low accuracy. Thus, it is concluded that it is not possible to estimate trends in heritability rates for the EPDG characteristic of Stayability by evaluating the SC of bulls in the age range presented in the study.

**Keywords:** Genomic DEP, Permanence Ability, Scrotal Perimeter.

## Perímetro testicular de touros aptos para reprodução associado ao índice de DEP genômica para probabilidade de parto precoce

Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>1</sup>, Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>1</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>1</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária Universidade Federal da Bahia – UFBA; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>3</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA

\*e-mail: matsumoto.matheus@hotmail.com

A pecuária brasileira registra, ano após ano, um aumento crescente nos seus índices produtivos, em consequência da adoção de novas tecnologias e ferramentas capazes de auxiliar nas tomadas de decisões por parte do produtor e profissional. No que diz respeito à escolha de reprodutores bovinos, estas novas ferramentas vão além dos parâmetros visuais fenotípicos conhecidos. A Diferença Esperada na Progênie (DEP) representa uma das tecnologias mais aplicadas na pecuária moderna, uma vez que, com o incremento do uso de marcadores moleculares e avaliação do DNA, possibilitou estimar a DEP genômica (DEPG). Tal método permite a predição das características morfológicas dos animais, de reprodução, fertilidade, crescimento, produtividade e eficiência alimentar, permitindo a identificação e seleção dos indivíduos geneticamente superiores para as características desejadas. Os parâmetros para cada características são expressos em valores de DEP, uma estimativa da diferença genética esperada entre a progênie do animal e a média da população. A Probabilidade de Parto Precoce (D3P) é uma característica associada à reprodução, indicadora de precocidade sexual, sendo ela a probabilidade de um reprodutor produzir fêmeas que, quando expostas precocemente à reprodução, possuem maiores chances de produzir um bezerro vivo até os 30 meses de idade. O presente trabalho objetivou correlacionar o perímetro escrotal (PE) com a DEPG para D3P. Para isso, foram utilizados dados de 72 touros nelores sexualmente maduros, genotipados, comercializados como reprodutores com idades entre 21 e 25 meses, localizados em uma propriedade na região do triângulo mineiro e do alto paranaíba do estado de Minas Gerais. Os valores de PE foram obtidos por meio de avaliação com fita métrica, graduada em milímetros, posicionada na região de maior perímetro da bolsa escrotal, conforme orientação do CBRA (2013). Os dados de D3P foram coletados a partir de dados públicos do programa de melhoramento da Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP). Os dados obtidos foram submetidos a testes estatísticos de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, sendo os dados não paramétricos correlacionados pelo teste de Spearman. Foi observada uma média de  $38,7 \pm 2,43$  cm para a característica de PE e uma média de  $77,5 \pm 6,45$  para o índice de D3P, não sendo encontradas correlações significativas entre a PE e D3P ( $p > 0,05$ ) dos animais deste estudo. A ausência de correlação entre PE e D3P vai contra aos dados amplamente disseminados na literatura, que citam correlação significativas entre dados biométricos dos testículos e características reprodutivas das fêmeas (Vozzi, 2008, Siqueira et al., 2013, Silva Neto, et al., 2020). Isto pode ser justificado pelo fato de que as aferições biométricas foram realizadas em animais já em idade reprodutiva, após o pico de crescimento gonadal que ocorre na puberdade, tendo ultrapassado os 365 dias e 450 dias nos quais há o estabelecimento definido de correlação entre a precocidade sexual e perímetro escrotal. Outro ponto importante para levar em consideração é que as DEPG para D3P aqui estudada são de touros apenas genotipados, não possuindo ainda filhos que comprovem tais índices, apresentando assim baixa acurácia. Desta forma, conclui-se que não é possível estimar tendências nas taxas de herdabilidade para a característica D3PG por meio da avaliação de PE de touros sexualmente maduros.

**Palavras-chave:** DEP Genômica, Precocidade Sexual, Perímetro Escrotal.

## Testicular perimeter of reproductive bulls associated with probability of early calving genomic EPD index

Matheus Augusto Matsumoto dos Santos<sup>1\*</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>2</sup>, Artur Azevedo Menezes<sup>2</sup>, Lara Lôbo Dantas<sup>2</sup>, Gabriel Santos Palma<sup>1</sup>, Luiz Fernando de Queiroz Souza<sup>1</sup>, Daniel Dourado<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>1</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>3</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária Universidade Federal da Bahia – UFBA; <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos – UFBA; <sup>3</sup>Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA

\*e-mail: matsumoto.matheus@hotmail.com

The Brazilian livestock registers, year after year, a growing increase in its productive indexes, because of the adoption of new technologies and tools capable of assisting in decision-making by the producer and professional. With regard to the choice of sires, these new tools go beyond the known phenotypic visual parameters. The Expected Progeny Difference (EPD) represents one of the most applied technologies in modern livestock, since, with the increased use of molecular markers and DNA evaluation, it has made it possible to estimate the genomic EPD (DEPG). This method allows the prediction of animal morphology, reproduction, fertility, growth, productivity and feed efficiency characteristics, allowing the identification and selection of genetically superior individuals for these desired characteristics. The parameters for each trait are expressed in EPD values, an estimate of the expected genetic difference between the animal's progeny and the population mean. The Probability of Early Childbirth (D3P) is a characteristic associated with reproduction, an indicator of sexual precocity, which is the probability that a sire will produce females that, when exposed early to reproduction, have a greater chance of producing a live calf up to 30 months old. The present work aimed to correlate the scrotal perimeter (SP) with the DEPG for D3P. For this, data from 72 sexually mature Nelore bulls, genotyped, intended for commercialization as sires, aged between 21 and 25 months, located on a property in the Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba region of the state of Minas Gerais were used. PE values were obtained by means of an evaluation with a measuring tape, graduated in millimeters, positioned in the region with the greatest perimeter of the scrotum, as per the guidelines of the CBRA (2013). D3P data were collected from public data from the Associação Nacional de Criadores e Produtores (ANCP) breeding program. The data obtained were subjected to statistical normality tests using the Shapiro-Wilk method, with non-parametric data correlated using the Spearman test. An average of  $38.7 \pm 2.43$  cm was observed for the PE characteristic and an average of  $77.5 \pm 6.45$  for the D3P index. No significant correlations were found between PE and D3P ( $p > 0.05$ ). The lack of correlation between PE and D3P go against the data widely disseminated in the literature, which cite significant correlations between testicular biometric data and reproductive characteristics of females (Vozzi, 2008, Siqueira et al., 2013, Silva Neto, et al., 2020). This can be justified by the fact that the biometric measurements were carried out in animals already of reproductive age, after the gonadal growth peak that occurs in puberty, having exceeded the 365 days and 450 days in which there is a definite establishment of correlation between precocity sex and scrotal perimeter. Another important point to take into account is that the DEPG for D3P studied here are from bulls that have only been genotyped, not yet having offspring that prove such indices, thus presenting low accuracy. Thus, it is concluded that it is not possible to estimate trends in the heritability rates for the D3PG trait by evaluating the EP of bulls in the age group studied here.

**Keywords:** Genomic DEP, Sexual Precocity, Scrotal Perimeter.

## Postectomia em bovino Senepol (*Bos taurus taurus*)

**Carolina Hori Venturim da Frota<sup>1\*</sup>, Amanda Nery Andrade de Moura<sup>1</sup>, Adriano de Oliveira Gordilho Filho<sup>2</sup>, Anna Fernanda Machado Sales da Cruz Ferreira<sup>3</sup>, Vitor Santiago de Carvalho<sup>3</sup>, Beatriz Mano e Silva<sup>3</sup>, Ícaro Farias Correia<sup>3</sup>, Luiza Gouvêa Teixeira<sup>5</sup>, Taires dos Santos Rodrigues<sup>4</sup>, Sara Maria Nascimento Jesus<sup>1</sup>, Natália Borges Miranda<sup>1</sup>, Gabriela Santana dos Anjos<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>5</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>5</sup>, Adamas Tassinari Bonfada<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>2</sup>Médico Veterinário do Hospital Veterinário Professor Renato Rodenburg de Medeiros Neto – UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup>Médico Veterinário do Centro de Desenvolvimento em Pecuária – UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Residente do Programa de Residência em Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária - UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária - UFBA, Salvador, BA, Brasil

\*E-mail: chvfrota@gmail.com

A acropostite consiste em um processo inflamatório e fibrótico na bainha prepucial, que leva à não exposição do pênis. O desenvolvimento desta inflamação está associado aos aspectos morfológicos do prepúcio alongado, porém outras características como manejo e ambiente, a exemplos das pastagens nativas de caules lenhosos e espinhosos, também podem influenciar o desenvolvimento em bovinos de origem européia (*Bos taurus taurus*), através de ferimentos e lacerações nesta região. As lesões não tratadas podem evoluir para infecção com larvas de *Daermtobia hominis*, abscedação, fibrose e avulsão prepucial, conseqüentemente resultando em impotência *coeundi*, além de prejuízos econômicos. Para correção deste tipo de processo, bem como suas lesões e complicações secundárias, é necessário tratamento cirúrgico. Foi atendido no Centro de Desenvolvimento da Pecuária da Universidade Federal da Bahia (CDP-EMEVZ-UFBA), em Oliveira dos Campinhos, Bahia, um bovino da raça Senepol, quatro anos, 660kg, escore corporal quatro, criado em sistema extensivo, pastagem nativa, com queixa principal de aumento de volume prepucial, com evolução de três meses. Ao exame físico, o prepúcio apresentou-se edemaciado e prolapsado, com óstio prepucial desviado caudalmente, acúmulo de líquido próximo ao óstio externo do prepúcio, drenagem fistulosa de conteúdo purulento, sensibilidade dolorosa aumentada e linfonodos pré-cruais reativos. Foi optado pela realização de correção cirúrgica pela técnica de postectomia. Foi administrado cetoprofeno a 10% (3,0mg/kg IV SID por cinco dias), higienização, ducha fria por 10 minutos e curativo com solução iodada, pomada cicatrizante, unguento e própolis nos cinco dias prévios à cirurgia, visando a redução da inflamação e edema regionais. Para o advento cirúrgico, o animal foi conduzido ao local da cirurgia à campo, onde foi realizada a anestesia com xilazina a 2% (0,3mg/kg IM) para contenção, além da antisepsia e tricotomia do local a ser manipulado. Posteriormente, para anestesia local, foi infiltrado cloridrato de lidocaína a 2% (5mg/kg SC) em todo o perímetro do prepúcio, para então, iniciar-se a técnica a partir de uma incisão no prepúcio, de forma losangular em 360° na região mais dorsal, onde a pele do prepúcio estava íntegra. Na sequência, fez-se a dissecação com duas incisões longitudinais no prepúcio, divulsionando a pele da mucosa, até alcançar a região lesionada, e fez-se a retirada total dos tecidos comprometidos. Para a sutura da pele do prepúcio com a mucosa restante do mesmo, realizou-se sutura de reparo e após conferência da abertura do óstio, utilizou-se padrão Donatti com fios absorvíveis sintéticos monofilamentares de polidioxanona. Como medicação pós cirúrgica, foi administrado meloxicam a 2% (0,5mg/kg IM SID por três dias), ceftiofur (50mg, 1mg/kg IM SID por 10 dias), dimetilsulfóxido local para massagem, evitando-se a ferida cirúrgica, extrato de própolis, Terracam<sup>®</sup> (cloridrato de oxitetraciclina 6,8g + hidrocortisona 2,8g + palmitato de vitamina A 0,01g), e unguento como repelente (SID). Aos primeiros quatro dias de pós-operatório, foi observada boa evolução da ferida cirúrgica e com exposição normal do pênis. Porém, após o quinto dia de pós-operatório, houve edema progressivo na região da cirurgia, na mesma medida em que o óstio prepucial desenvolveu estenose com sensibilidade dolorosa e dificuldade para exposição do pênis. Ainda nesse momento, foi observada acúmulo de urina dentro da bolsa prepucial reconstruída. No décimo dia, houve agravamento do quadro com estenose importante do óstio prepucial, impossibilitando sua retração, aumento da sensibilidade dolorosa no local da cirurgia, além de sinais sistêmicos de infecção (leucocitose com neutrofilia). O ceftiofur foi mantido por mais 10 dias e o meloxicam foi reintroduzido por mais cinco dias, em mesma dose e intervalo. Também foram realizadas massagens com dimetilsulfóxido, duas vezes ao dia, e Naquasone<sup>®</sup> (triclorometiazina 100mg + dexametasona 0,5mg; 20 ml IM SID, por dois dias). Foi dada continuidade com os curativos e, as duchas quente e fria, foram intensificadas em intervalos de 12 horas. Os pontos foram removidos após 12 dias, quando houve redução do edema e da estenose, possibilitando a exposição do pênis sem dificuldade. A pedido do proprietário, o paciente teve alta hospitalar, com recomendações para continuação dos curativos e duchas na propriedade. De acordo com relato do proprietário, o animal retornou à reprodução sem mais intercorrências. Conforme o descrito, pode-se dizer que a postectomia foi eficiente para o tratamento da acropostite em grau avançado em um touro reprodutor da raça Senepol.

**Palavras-chave:** acropostite, impotência *coeundi*, prepúcio, prolapso



## Postectomy in Senepol bovine (*Bos taurus taurus*)

**Carolina Hori Venturim da Frota<sup>\*1</sup>, Amanda Nery Andrade de Moura<sup>1</sup>, Adriano de Oliveira Gordilho Filho<sup>2</sup>, Luiza Gouvêa Teixeira<sup>2</sup>, Anna Fernanda Machado Sales da Cruz Ferreira<sup>3</sup>, Vitor Santiago de Carvalho<sup>3</sup>, Beatriz Mano e Silva<sup>3</sup>, Ícaro Farias Correia<sup>3</sup>, Adamas Tassinari Bonfada<sup>2</sup>, Taires dos Santos Rodrigues<sup>1</sup>, Sara Maria Nascimento Jesus<sup>1</sup>, Natália Borges Miranda<sup>1</sup>, Gabriela Santana dos Anjos<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>1</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA; <sup>2</sup>Hospital Veterinário Professor Renato Rodenburg de Medeiros Neto - UFBA; <sup>3</sup>Centro de Desenvolvimento em Pecuária - UFBA

\*E-mail: chvfrota@gmail.com

Acroposthitis consists of an inflammatory and fibrotic process in the preputial sheath, which leads to non-exposure of the penis. The development of this inflammation is associated with the morphological aspects of the elongated prepuce, but other characteristics such as management and environment, such as native pastures with woody and thorny stems, can also influence the development of cattle of European origin (*Bos taurus taurus*), through injuries and lacerations in this region. Untreated lesions can progress to infection with *Daermatobia hominis* larvae, abscessation, fibrosis and preputial avulsion, consequently resulting in impotence coeundi, in addition to economic losses. To correct this type of process, as well as its injuries and secondary complications, surgical treatment is necessary. At the Centro de Desenvolvimento da Pecuária da Universidade Federal da Bahia (CDP-EMEVZ-UFBA), in Oliveira dos Campinhos, Bahia, a Senepol cattle, four years old, 660 kg, body score four, raised in an extensive system, native pasture, with the main complaint of increased preputial volume, with a three-month evolution. On physical examination, the foreskin was edematous and prolapsed, with a caudally deviated preputial ostium, accumulation of fluid near the external foreskin ostium, fistulous drainage of purulent content, increased pain sensitivity, and reactive precrucial lymph nodes. It was decided to carry out surgical correction using the postectomy technique. Ketoprofen 10% (3.0mg/kg IV SID was administered for five days), hygiene, cold shower for 10 minutes and dressing with iodine solution, healing ointment, ointment and propolis in the five days prior to surgery, aiming at reducing inflammation and regional edema. For the surgical advent, the animal was taken to the field surgery site, where anesthesia was performed with 2% xylazine (0.3mg/kg IM) for containment, in addition to antisepsis and trichotomy of the site to be manipulated. Subsequently, for local anesthesia, 2% lidocaine hydrochloride (5mg/kg SC) was infiltrated around the perimeter of the foreskin, and then the technique was started from an incision in the foreskin, in a lozenge shape in 360° in the region more dorsally, where the skin of the foreskin was intact. Next, dissection was performed with two longitudinal incisions in the foreskin, dividing the skin from the mucosa, until reaching the injured region, and the compromised tissues were completely removed. For the suture of the skin of the foreskin with the remaining mucosa, a repair suture was performed and after checking the opening of the ostium, Donatti standard was used with absorbable synthetic monofilament polydioxanone threads. As post-surgical medication, 2% meloxicam (0.5mg/kg IM SID for three days), ceftiofur (50mg, 1mg/kg IM SID for 10 days), local dimethylsulfoxide for massage was administered, avoiding the surgical wound, propolis extract, Terracam<sup>®</sup> (6.8g oxytetracycline hydrochloride + 2.8g hydrocortisone + 0.01g vitamin A palmitate), and repellent ointment (SID). On the first four postoperative days, good evolution of the surgical wound was observed, with normal exposure of the penis. However, after the fifth postoperative day, there was progressive edema in the surgery region, to the same extent that the preputial ostium developed stenosis with painful sensitivity and difficulty in exposing the penis. Even at that moment, accumulation of urine was observed inside the reconstructed preputial pouch. On the tenth day, there was a worsening of the condition with significant stenosis of the preputial ostium, making it impossible to retract, increased pain sensitivity at the surgical site, in addition to systemic signs of infection (leukocytosis with neutrophilia). Ceftiofur was maintained for another 10 days and meloxicam was reintroduced for another five days, at the same dose and interval. Massages were also performed with dimethylsulfoxide, twice a day, and Naquason<sup>®</sup> (trichloromethiazine 100mg + dexamethasone 0.5mg; 20 ml IM SID, for two days). The dressings were continued and the hot and cold showers were intensified at 12-hour intervals. The stitches were removed after 12 days, when there was a reduction in edema and stenosis, allowing the penis to be exposed without difficulty. At the owner's request, the patient was discharged from the hospital, with recommendations to continue dressing and showering on the property. According to the owner's report, the animal returned to reproduction without further complications. As described, it can be said that postectomy was efficient for the treatment of advanced acroposthitis in a Senepol breeding bull.

**Keywords:** acroposthitis, coeundi impotence, prepuce, prolapse



## Protocolo para tratamento de adenite vesicular (vesiculite) aguda em touros

Neimar Correa Severo<sup>1\*</sup>, Teresinha Inês Assumpção<sup>1</sup>, Renata Lançoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU), Uberlândia, MG, Brasil

\*e-mail: nsevero@gmail.com

A adenite vesicular (vesiculite) é um dos mais frustrantes problemas reprodutivos encontrado na avaliação andrológica de touros em centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS). Tentativas de diagnóstico, tratamento e recuperação clínica podem conduzir a resultados com sucesso, porém, muitos touros afetados são refratários para vários regimes de tratamentos. Subsequentemente, um touro com adenite vesicular aguda pode estar em boas condições físicas, com libido satisfatória e boa capacidade de produção, mas o sêmen não pode ser processado para congelamento e comercialização devido a presença de pus no ejaculado. A adenite vesicular é um processo inflamatório da glândula vesicular e essa inflamação frequentemente resulta na presença de piócitos (pus) no sêmen. As principais bactérias presentes na adenite vesicular são a *Trueperella pyogenes*, o *Histophilus somni*, a *Escherichia coli* e outras bactérias de origem comum em processos inflamatórios e abscessos. Porém o agente infeccioso pode ou não ser identificado pela espermocultura como agente etiológico. Os sintomas clínicos da adenite vesicular aguda são semelhantes a peritonite aguda, com desconforto, tenesmo ou claudicação dos membros posteriores; no entanto, geralmente não apresenta sinais clínicos evidentes além das alterações do ejaculado, com a presença de muitos leucócitos polimorfonucleares (>5 PMN por cada campo contado na lâmina corada), com predominância de neutrófilos. A maior viscosidade do líquido vesicular e alterações no seu pH podem reduzir a motilidade espermática e a congelabilidade, com baixa sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelamento no sêmen criopreservado. O objetivo do protocolo para tratamento de casos de vesiculite em touros foi melhorar o meio de diagnóstico bem como realizar o tratamento precoce da infecção para reduzir o alto percentual de recidivas que ocorrem nesses casos. Para isso, foram utilizados 5 animais selecionados da seguinte forma: todos os touros em coleta de sêmen que apresentavam presença de piócitos no sêmen puro foram avaliados pelo "Califórnia Mastite Teste" (CMT). Os casos reagentes ao CMT (maior ou igual a 1 cruz) eram submetidos a contagem de leucócitos em esfregaço corado pela coloração Panóptico Rápido e nas contagens maiores que 5 PMN por campo eram submetidos a ultrassonografia modo B para avaliação clínica da vesiculite. Identificando-se ou não lesões no ultrassom, os touros que apresentaram os outros parâmetros positivos para adenite vesicular foram submetidos ao protocolo padrão para tratamento da vesiculite, com a aplicação da base antibiótica tulatromicina na dosagem de 2,5mg/kg de peso corporal (1ml/40kg de peso vivo) por via subcutânea conforme bula e, a mesma dosagem foi repetida após 5 dias de intervalo. Associado ao antibiótico foi aplicado 0,5mg/kg de peso corporal (2,5ml/100kg de peso vivo) de meloxicam a 2% por via intramuscular durante 5 dias, conforme recomendação da bula. Dos 5 casos tratados de acordo com o protocolo proposto ocorreu a recuperação de 3 animais em 28 dias após a aplicação do tratamento e em 1 animal 45 dias após o tratamento (60% nos primeiros 28 dias e 80% com 45 dias). O quinto animal tratado continuou eliminando piócitos no sêmen até o final do período de controle de 45 dias. Como conclusão, apesar do pequeno grupo de touros tratados para vesiculite aguda, podemos considerar que o protocolo utilizado para os casos descritos é útil para recuperação de doadores de sêmen com essa infecção; e que a tulatromicina associada ao meloxicam é um procedimento terapêutico eficiente.

**Palavras-chave:** bovino, glândula vesicular, infecção aguda, diagnóstico, tratamento

## Protocol for the treatment of acute vesicular adenitis (vesiculitis) in bulls

Neimar Correa Severo<sup>1\*</sup>, Teresinha Assumpção<sup>2</sup>, Renata Lançoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU), Uberlândia, MG, Brasil

\*e-mail: nsevero@gmail.com

Vesicular adenitis (vesiculitis) is one of the most frustrating reproductive problems encountered in the andrological evaluation of bulls in semen collection and processing centers (CCPS). Attempts at diagnosis, treatment and clinical recovery can lead to successful results, however, many affected bulls are refractory to various treatment regimens. Subsequently, a bull with acute vesicular adenitis may be in good physical condition, with satisfactory libido and good production capacity, but the semen cannot be processed for freezing and commercialization due to the presence of pus in the ejaculate. Vesicular adenitis is an inflammatory process of the vesicular gland and this inflammation often results in the presence of pyocytes (pus) in the semen. The main bacteria present in vesicular adenitis are *Trueperella pyogenes*, *Histophilus somni*, *Escherichia coli* and other bacteria of common origin in inflammatory processes and abscesses. The infectious agent may or may not be identified by sperm culture as the etiological agent. Clinical symptoms of acute vesicular adenitis are similar to acute peritonitis, with hind limb discomfort, tenesmus, or lameness; however, it usually does not show clinical signs than changes in the ejaculate, with the presence of many polymorphonuclear leukocytes (>5 PMN for each field counted on the stained slide), with a predominance of neutrophils. The greater viscosity of the vesicular fluid and changes in its pH may reduce sperm motility and freezability, with poor sperm survival after thawing in cryopreserved semen. The objective of the protocol for the treatment of cases of vesiculitis in bulls was to improve the means of diagnosis as well as to carry out the early treatment of the infection to reduce the high percentage of relapses that occur in these cases. For this, 5 animals were selected as follows: all bulls in semen collection that presented the presence of pyocytes in pure semen were evaluated by the "California Mastitis Test" (CMT). Cases reactive to CMT (greater than or equal to 1 cross) were submitted to leukocyte counts in stained smears with Rapid Panopticon staining, and in counts greater than 5 PMN per field, they were submitted to B-mode ultrasonography for clinical evaluation of vesiculitis. Whether or not lesions were identified on ultrasound, the bulls that presented the other positive parameters for vesicular adenitis were submitted to the standard protocol for the treatment of vesiculitis, with the application of the antibiotic base tulathromycin at a dosage of 2.5mg/kg of body weight (1ml /40kg of body weight) subcutaneously according to the package leaflet, and the same dosage was repeated 5 days apart. Associated with the antibiotic, 0.5mg/kg of body weight (2.5ml/100kg of body weight) of 2% meloxicam was administered intramuscularly for 5 days, as recommended in the package leaflet. In 5 cases treated according to the proposed protocol, recovery occurred in 3 animals within 28 days after application of the treatment and in 1 animal 45 days after treatment (60% in the first 28 days and 80% after 45 days). The fifth treated animal continued to shed pyocytes in semen until the end of the 45-day control period. In conclusion, despite the small group of bulls treated for acute vesiculitis, we can consider that the protocol used for the cases described is useful for the recovery of semen donors with this infection and that tulathromycin associated with meloxicam is an efficient therapeutic procedure.

**Keywords:** bovine, vesicular gland, acute infection, diagnosis, treatment.

## Qualidade de sêmen bovino criopreservado avaliada por árvore de decisão para predição da fertilidade em IATF de vacas zebuínas

Francisco Eduardo Machado Vaz<sup>1</sup>, Ériklis Nogueira<sup>2</sup>, Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>3\*</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil; <sup>2</sup> Embrapa Pantanal-Gado de Corte, Brasil; <sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil;

<sup>4</sup> Embrapa Pantanal, Brasil

GERA-MS/CNPq – Grupo de Estudos em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul

\*e-mail: eliane.silva@ufms.br

O estudo foi conduzido com objetivo de buscar correlações das análises laboratoriais do sêmen criopreservado com a taxa de prenhez para predição de fertilidade em vacas zebuínas submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. Foram realizados testes laboratoriais com amostras de sêmen de 71 touros das raças Nelore e Angus, utilizadas na IATF de 13.174 vacas Nelore, no estado de Mato Grosso do Sul. Para determinação da qualidade espermática, avaliou-se motilidade e vigor pós-descongelamento, concentração espermática, análise morfológica e teste de termo resistência rápido (TTR). A análise computadorizada para avaliação da cinética espermática foi determinada pelo equipamento *Computer Assisted Semen Analyse* (CASA), modelo *Ivos-Ultimate*, e análise dos seguintes parâmetros: motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade média ( $\mu\text{m/s}$ ; VAP), velocidade retilínea ( $\mu\text{m/s}$ ; VSL), velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ; VCL), amplitude lateral de cabeça ( $\mu\text{m}$ ; ALC), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR). Os procedimentos de citometria de fluxo foram realizados utilizando o equipamento *CytoFLEX™* avaliando a integridade de membrana plasmática e o potencial mitocondrial. Os parâmetros mais significativos para prenhez foram submetidos à análise de regressão logística (Proc Logistic do SAS) que gerou a equação:  $P/IA = -0,11 + (ECC \times 0,0589) - (\text{integra} \times 0,004) + (\text{polarizada} \times 0,0070) + (\text{motcasa} \times 0,0109) + (\text{vigor} \times 0,15) - (\text{defeitos totais} \times 0,0069) - (\text{progcasa} \times 0,024) - (\text{vsl} \times 0,0052)$ . As variáveis mais efetivas para a prenhez (P/IA), quando em conjunto, foram obtidas pelo software Weka 3.8, por meio do classificador J48, produzindo uma árvore de decisão, em que os parâmetros identificados como mais importantes para predição de prenhez em IATF foram: Motilidade Progressiva, Motilidade Total e velocidade retilínea (VSL) no CASA, integridade de membrana plasmática, vigor espermático e defeitos totais. A taxa de prenhez média observada foi igual a calculada pela equação gerada, assim, concluímos que o modelo é multifatorial com situações de compensação que devem ser consideradas nas análises.

**Palavras-chave:** bovinos de corte, cinética espermática, C.A.S.A, taxa de concepção.

**Apoio financeiro:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Cryopreserved bovine semen quality assessed by decision tree for fertility prediction in FTAI of zebu cows.

Francisco Eduardo Machado Vaz<sup>1</sup>, Ériklis Nogueira<sup>2</sup>, Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>3\*</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil; <sup>2</sup> Embrapa Pantanal-Gado de Corte, Brasil; <sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>4</sup> Embrapa Pantanal, Brasil

GERA-MS/CNPq – Grupo de Estudos em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul

\*e-mail: eliane.silva@ufms.br

The study was conducted with the objective of looking for correlations of laboratory analyzes and pregnancy rate for fertility prediction in FTAI of zebu cows. Laboratory tests were carried out with semen samples from 71 Nelore and Angus bulls, used in the FTAI of 13,174 Nelore cows, in the state of Mato Grosso do Sul. To determine sperm quality, post-thawing motility and vigor, sperm concentration, morphological analysis, and rapid thermo-resistance test (TTR) were evaluated. Computerized analysis to evaluate sperm kinetics was determined by the Computer Assisted Semen Analyze (CASA), Ivos-Ultimate model, and analysis of parameters: total motility (%; MT), progressive motility (%; MP), mean velocity ( $\mu\text{m/s}$ ; VAP), rectilinear velocity ( $\mu\text{m/s}$ ; VSL), curvilinear velocity ( $\mu\text{m/s}$ ; VCL), lateral head amplitude ( $\mu\text{m}$ ; ALC), linearity (%; LIN), and rectilinearity (%; STR). Flow cytometry procedures were performed using the CytoFLEX™ equipment evaluating plasma membrane integrity and mitochondrial potential assessment. The most significant parameters for pregnancy were submitted to logistic regression analysis (Proc Logistic of SAS) which generated the equation:  $P/IA = -0.11 + (ECC \times 0.0589) - (\text{integral} \times 0.004) + (\text{polarized} \times 0.0070) + (\text{motcasa} \times 0.0109) + (\text{vigor} \times 0.15) - (\text{total defects} \times 0.0069) - (\text{progcasa} \times 0.024) - (\text{vsl} \times 0.0052)$ . The most effective variables for pregnancy (P/AI), when taken together, were obtained by the Weka 3.8 software, using the J48 classifier, producing a decision tree, in which the parameters identified as the most important for predicting pregnancy in FTAI they were: Progressive Motility, Total Motility, and Rectilinear Velocity (VSL) in CASA, Plasma Membrane Integrity, Sperm Vigor, and Total Defects. The average pregnancy rate observed was equal to that calculated by the generated equation, thus, we conclude that the model is multifactorial with compensation situations that must be considered in the analyses.

**Keywords:** beef cattle, conception rate, Computer analysis, spermatoc kinetic.

**Financial support:** This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”.

## Relação entre perímetro escrotal, peso e idade em touros da raça Nelore

Teresinha Inês Assumpção\*, Eligiane Priscila Meurer, Thamiris Pinheiro Melo

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG

\*e-mail: teassumpcao@ufu.br

O Brasil detém um rebanho bovino em torno de 224,5 milhões de cabeças, com aproximadamente 80% dos animais da raça Nelore (IBGE,2021). Os touros têm um papel importante nesta cadeia e devem ser selecionados para que sejam capazes de imprimir características econômicas desejáveis à sua prole como fertilidade, precocidade, ganho de peso, entre outras. Um fator importante que afeta a desempenho reprodutivo é o tamanho dos testículos, pois acredita-se que o perímetro escrotal aumenta com a idade e o peso do animal de forma progressiva até a puberdade e depois mais lento indicando a maturidade sexual, e está diretamente ligado a produção total de espermatozoides e a reserva espermática. Este estudo teve por objetivo verificar a relação entre idade, peso e perímetro escrotal em touros da raça Nelore. Foram utilizados 45 touros da raça Nelore PO de uma fazenda do Estado do Tocantins. A pastagem era de Tanzânia e Mombaça e o sal mineral era fornecido *ad libitum*. Foi fornecida uma suplementação média de 2,5 Kg de concentrado com 16% de proteína e sem ureia/ animal/dia. A pesagem foi feita em balança comercial e o perímetro escrotal (PE) aferido com fita métrica própria, com avaliação feita a cada 30 dias dos 11 aos 19 meses de idade dos animais, nos meses de outubro a maio. Os dados foram calculados como média e desvio padrão do grupo e foi feita uma análise de correlação entre idade, peso e PE utilizando a correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ). No estudo, o peso e PE iniciais foram, respectivamente,  $220,5 \pm 15,9$  kg e  $20,5 \pm 1,2$  cm e o final de  $442,9 \pm 25,6$  kg e  $30,5 \pm 1,9$  cm. O PE teve um crescimento médio de 1,25 cm mensais ao longo dos 8 meses da pesquisa, apresentando maiores crescimentos entre 12 e 13 meses e 14 e 17 meses. O ganho de peso médio de 11 a 15 meses foi de 1,2 Kg/mês e a partir daí 0,83 kg/mês. Os testículos cresceram proporcionalmente com o crescimento do animal e seu peso, porém o PE dos animais desta pesquisa, que foram criados a campo, apresentaram-se menores que o esperado para a idade, mas semelhante aos relatos da literatura que afirmam que os animais da raça Nelore possuem testículos mais alongados que outras raças, apresentando assim PE menor. A PE teve um crescimento médio de 0,041 cm diários ao longo dos 8 meses da pesquisa, valor este bem mais elevado que os relatados na literatura que mostram ainda que o PE tem crescimento cúbico, ou seja, cresce muito rápido em idades precoces e tende a reduzir seu crescimento com o aumento da idade do animal. Verificamos neste estudo que nas fases mais precoces de idade houve um maior ganho de peso e crescimento do perímetro escrotal, o que é validado por outros estudos com touros da raça Nelore que mostraram que entre 10 e 12 meses de idade há rápida proliferação do parênquima dos testículos com grande desenvolvimento testicular, rápido ganho de peso, aumento da secreção de LH e início da espermatogênese. As correlações entre PE X peso e PE x idade foram positivas e significativas em todas as idades, porém não verificou correlação entre peso X idade. Estas correlações também são referenciadas em outros estudos que relatam ainda que a associação fenotípica entre peso corporal e PE pode estar relacionada as diferenças ambientais (nutrição, infecção parasitária, clima, etc.) que afetam ambas as características. Além destas correlações fenotípicas, a literatura faz referência ainda as correlações genéticas altas e favoráveis entre PE e peso corporal indicando assim compatibilidade de seleção para crescimento corporal e fertilidade nos programas de seleção de reprodutores da raça Nelore. O estudo mostrou que o PE cresce linearmente com o peso dos animais, sendo assim o perímetro escrotal pode ser utilizado como critério de seleção de reprodutores, principalmente para animais jovens, melhorando assim sua eficiência reprodutiva, o que reflete diretamente no desempenho produtivo dos rebanhos de gado de corte.

**Palavras-chave:** bovinos, reprodução, testículos, desenvolvimento corporal.

## Relationship between scrotal perimeter, weight, and age in Nelore bulls

Teresinha Inês Assumpção\*, Eligiane Priscila Meurer, Thamiris Pinheiro Melo

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG

\*e-mail: teassumpcao@ufu.br

Brazil has a bovine herd of around 224.5 million head, with approximately 80% of the animals of the Nelore breed (IBGE, 2021). Bulls play an important role in this chain and must be selected so that they are able to imprint desirable economic characteristics on their offspring, such as fertility, precocity, weight gain, among others. An important factor that affects reproductive performance is the size of the testes, as it is believed that the scrotal perimeter increases with the age and weight of the animal, progressively until puberty and then more slowly indicating sexual maturity. It is directly associated with total sperm production and sperm reserve. This study aimed to verify the relationship between age, weight, and scrotal perimeter in Nelore bulls. Forty-five Nelore PO bulls were used on a farm in the state of Tocantins. The pasture was from Tanzania and Mombasa and mineral salt was supplied *ad libitum*. An average supplementation of 2.5 kg of concentrate with 16% protein and without urea/animal/day was provided. The weighing was performed on a commercial balance and the scrotal perimeter (SP) was measured using a measuring tape, with assessments carried out every 30 days from 11 to 19 months of age, in the months of October to May. The data were calculated as the mean and standard deviation of the group and a Pearson's correlation analysis was performed to examine the relationship between age, weight, and SP ( $p < 0.05$ ). In this study, the initial weight and SP were  $220.5 \pm 15.9$  kg and  $20.5 \pm 1.2$  cm, respectively, while the final weight and SP were  $442.9 \pm 25.6$  kg and  $30.5 \pm 1.9$  cm, respectively. The scrotal perimeter had an average monthly growth of 1.25 cm over the 8 months of the research, showing greater growth between 12 - 13 months and 14 - 17 months. The average weight gain from 11 to 15 months was 1.2 kg/month and thereafter 0.83 kg/month. The testicles grew proportionally with the growth of the animal and its weight, however, the SP of the animals in this research, which were raised in the field, were smaller than expected for their age, but similar to reports in the literature that state that the animals of the Nelore breeds have more elongated testicles than other breeds, thus presenting lower SP. The scrotal perimeter had an average daily growth of 0.041 cm over the 8 months of the research, which is much higher than the values reported in the literature. Furthermore, SP was found to have cubic growth, meaning that it grows rapidly at early ages and then slows down with the increasing age of the animal. In this study, we verified that in the earlier stages of age, there was a greater weight gain and growth of the scrotal perimeter, which is validated by other studies with Nelore bulls that showed that between 10 and 12 months of age there is a rapid proliferation of the parenchyma of the testes with great testicular development, rapid weight gain, increased LH secretion and onset of spermatogenesis. The correlations between SP vs. weight, and SP vs. age were significant at all ages, but there was no correlation between weight vs. age. These correlations are also referenced in other studies that report that the phenotypic association between body weight and SP may be related to environmental differences (nutrition, parasitic infection, climate, etc.) that affect both characteristics. In addition to these phenotypic correlations, the literature also reports to the high and favorable genetic correlations between SP and body weight, indicating compatibility of selection for body growth and fertility in selection programs for Nelore sires. The study showed that SP grows linearly with the weight of the animals, therefore scrotal perimeter can be used as a criterion for breeding selection, mainly for young animals, to improve reproductive efficiency, which directly reflects on the productive performance of beef cattle herds.

**Keywords:** Cattle, reproduction, testis, body development.



## Tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros com aplicação de células tronco mesenquimais alogênicas diretamente nas glândulas afetadas – resultados preliminares

Neimar Correa Severo<sup>1</sup>, Ana Clara Faquineli Cavalcante<sup>2</sup>, Ricardo Araújo Micaí<sup>2</sup>, Adolfo Firmo Ferreira<sup>2</sup>,  
Teresinha Inês Assumpção<sup>1</sup>, Maurício Antônio Silva Peixer<sup>3</sup>, Marcelo da Cunha Xavier<sup>3</sup>, Renata Lanconi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

<sup>3</sup>BioCell Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

\*e-mail: renata.lanconi@ufu.br

A adenite vesicular (vesiculite) é um processo inflamatório que acomete as glândulas vesiculares do touro. O quadro clínico possui etiologia de difícil definição, sendo a infecção bacteriana considerada a causa mais frequente porém a causa primária é indefinida. Os principais microrganismos identificados na espermocultura como agentes etiológicos da vesiculite são *Trueperella pyogenes*, *Histophilus somni*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma bovinogenitalium*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum* e outras bactérias de origem comum em processos inflamatórios. Os sinais clínicos são inespecíficos ou ausentes, o que torna o diagnóstico precoce da doença ainda mais complexo na rotina. Esta enfermidade pode levar a redução da fertilidade de touros em regime de monta natural e touros doadores de sêmen em centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS). O diagnóstico, tratamento e manejo da vesiculite pode conduzir a terapêutica mais adequada em casos agudos, porém em casos crônicos, os resultados são frustrantes, porque muitos touros afetados são refratários aos diferentes tipos de tratamentos. As células-tronco mesenquimais (CTM) alogênicas caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes produzidas a partir de vários tecidos orgânicos, como por exemplo tecido adiposo. As CTM expressam muitas moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, estimulando a angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual. O objetivo deste experimento foi observar a influência da aplicação de CTM alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares inflamadas através da injeção intraglandular para avaliar a eficiência deste tratamento na recuperação e na prevenção de recidivas da vesiculite. Cinco touros foram selecionados em CCPS (CEUA 23117.051597/2022-62) quando apresentavam vesiculite crônica, com duas ou mais recidivas, através da presença de pus no sêmen, piócitos na lâmina de avaliação de motilidade e vigor, teste do California Mastite Teste - CMT (acima de uma cruz) e contagem de leucócitos em lâmina corada pelo Panóptico Rápido com mais de 5 polimorfonucleares (PMN) por campo. Foi realizado o exame ultrassonográfico das glândulas vesiculares, porém, os sinais clínicos foram definitivos para o diagnóstico. O método de injeção intraglandular de CTM proposto foi a aplicação através da fossa isquiorretal com agulha longa de 35cm e guia de 30cm diretamente na glândula vesicular afetada. As CTM foram congeladas no laboratório BioCell Terapia Celular (Brasília, DF, Brasil) e preparadas por lavagem e centrifugação para a injeção intraglandular no dia da aplicação. Foram injetadas  $3 \times 10^6$  CTM por glândula vesicular. As variáveis analisadas foram: volume do ejaculado (mL), motilidade e vigor (%; 1 a 5) em microscopia de luz, concentração (milhões de espermatozoides/mL), número de espermatozoides totais no ejaculado, morfologia espermática avaliada em contraste de fase em aumento de 1000 vezes, CMT utilizando 0,5 mL de sêmen mais 2,5 mL do reagente (classificação de 0 a 3 cruzeiros), ultrassonografia das glândulas vesiculares (avaliadas em escala de 1 a 5, sendo 1- normais, 2- com áreas hiperecogênicas, 3- com áreas hiperecogênicas e paredes espessadas, 4- com áreas hiperecogênicas, paredes espessadas e cistos, 5- com áreas hiperecogênicas, paredes espessadas, cistos e presença de fibrose) e crescimento de colônias bacterianas na espermocultura. Todas as variáveis foram mensuradas antes e após o tratamento. Os dados estão apresentados de maneira descritiva, como média e desvio padrão, por incluir dados preliminares dos primeiros 5 animais tratados. Os dados observados antes e depois do tratamento, respectivamente foram: volume de 4,1 ( $\pm 1,87$ ) e 5,5 ( $\pm 1,06$ ), motilidade espermática 64,6 ( $\pm 15,3$ ) e 64,6 ( $\pm 14,3$ ), a concentração/mL foi de 1,4 ( $\pm 0,37$ ) e 1 ( $\pm 0,44$ ) bilhões de espermatozoides/mL, o número de espermatozoides totais no ejaculado foi de 5,2 ( $\pm 1,5$ ) e 11,0 ( $\pm 5,2$ ) bilhões, o teste de CMT foi de 2,2+ ( $\pm 1,1+$ ) para 1,6+ ( $\pm 1,5+$ ), o escore de avaliação das glândulas vesiculares foi de 3,2 ( $\pm 0,83$ ) para 2,6 ( $\pm 1,5$ ). A avaliação do crescimento de colônias bacterianas foi realizada e, até o momento, em uma amostra de dois touros foi observada uma média de 57 colônias antes do tratamento e 11,5 colônias após o tratamento. Na análise da morfologia espermática os touros apresentaram 14,6% ( $\pm 9,2$ ) de defeitos maiores e 20,6% ( $\pm 7,5$ ) de defeitos totais antes do tratamento e 12,3% ( $\pm 5,3$ ) de defeitos maiores e 18,5% ( $\pm 5,4$ ) de defeitos totais após o tratamento. De acordo com os dados apresentados, podemos concluir que a aplicação de CTM alogênicas para tratamento da adenite vesicular em touros tem potencial terapêutico por apresentar melhora no aspecto ultrassonográfico das glândulas, diminuição dos valores no teste CMT e diminuição de crescimento bacteriano após o tratamento.

**Palavras-chave:** bovino, vesiculite, tratamento, células-tronco

## Treatment of vesicular adenitis (vesiculitis) in bulls with application of allogeneic mesenchymal stem cells directly to the affected glands – preliminary results

Neimar Correa Severo<sup>1</sup>, Ana Clara Faquineli Cavalcante<sup>2</sup>, Ricardo Araújo Micai<sup>2</sup>, Adolfo Firmo Ferreira<sup>2</sup>,  
Teresinha Inês Assumpção<sup>1</sup>, Maurício Antônio Silva Peixer<sup>3</sup>, Marcelo da Cunha Xavier<sup>3</sup>, Renata Lanconi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

<sup>3</sup>BioCell Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

\*e-mail: renata.lanconi@ufu.br

Vesicular adenitis (vesiculitis) is an inflammatory process that affects the vesicular glands of the bull. The clinical condition has an etiology that is difficult to define, with bacterial infection being considered the most frequent cause, but the primary cause is undefined. The main microorganisms identified in sperm culture as etiological agents of vesiculitis are *Trueperella pyogenes*, *Histophilus somni*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma bovinegenitalium*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum* and other bacteria of common origin in inflammatory processes. Clinical signs are nonspecific or absent, which makes the early diagnosis of the disease even more complex in routine. This disease can lead to reduced fertility of natural-breeding bulls and semen donor bulls in semen collection and processing centers (SCPC). Diagnosis, treatment and management of vesiculitis can lead to the most appropriate therapy in acute cases, but in chronic cases, the results are disappointing, because many affected bulls are refractory to different types of treatments. Allogeneic mesenchymal stem cells (MSC) are characterized by being a population of multipotent cells produced from various organic tissues, such as adipose tissue. MSCs express many bioactive molecules such as adhesion molecules, extracellular matrix proteins, cytokines and receptors for growth factors, allowing interactions with other cells. These molecules act by modulating the inflammatory response, stimulating angiogenesis and mitosis of cells involved in the tissue repair process. The objective of this experiment was to observe the influence of the application of allogeneic MSCs directly in the inflamed vesicular glands through intraglandular injection to evaluate the efficiency of this treatment in the recovery and prevention of vesiculitis recurrences. Five bulls were selected in SCPC (CEUA 23117.051597/2022-62) when they had chronic vesiculitis, with two or more recurrences, through the presence of pus in the semen, pyocytes in the motility and vigor evaluation slide, California Mastitis Test - CMT (above a cross) and leukocyte count in slide stained by the quick panoptic stain with more than 5 polymorphonuclear cells (PMN) per field. Ultrasound examination of the vesicular glands was performed; however, the clinical signs were definitive for the diagnosis. The MSCs intraglandular injection method proposed was the application through the ischioanal fossa with a 35cm long needle and a 30cm guide directly into the affected vesicular gland. MSCs were frozen in the laboratory BioCell Terapia Celular (Brasília, DF, Brazil) and prepared by washing and centrifugation for intraglandular injection on the day of application.  $3 \times 10^6$  MSCs were injected per vesicular gland. The variables analyzed were: ejaculate volume (mL), motility and vigor (%; 1 to 5) in light microscopy, concentration (millions of spermatozoa/mL), number of total spermatozoa in the ejaculate, sperm morphology evaluated in phase contrast at 1000x magnification, CMT using 0.5 mL of semen plus 2.5 mL of the reagent (classification from 0 to 3 crosses), ultrasound of the vesicular glands (evaluated on a scale of 1 to 5, with 1- normal, 2- with hyperechogenic areas, 3- with hyperechogenic areas and thickened walls, 4- with hyperechogenic areas, thickened walls and cysts, 5- with hyperechogenic areas, thickened walls, cysts and presence of fibrosis) and growth of bacterial colonies in sperm culture. All variables were measured before and after treatment. Data are presented descriptively, as mean and standard deviation, as they include preliminary data from the first 5 treated animals. The observed data before and after treatment, respectively were: volume 4.1 ( $\pm 1.87$ ) and 5.5 ( $\pm 1.06$ ), sperm motility 64.6 ( $\pm 15.3$ ) and 64.6 ( $\pm 14.3$ ), the concentration/mL was 1.4 ( $\pm 0.37$ ) and 1 ( $\pm 0.44$ ) billion spermatozoa /mL, the number of total spermatozoa in the ejaculate was 5.2 ( $\pm 1.5$ ) and 11.0 ( $\pm 5.2$ ) billion, the CMT test was 2.2+ ( $\pm 1.1+$ ) to 1.6+ ( $\pm 1.5+$ ), the vesicular gland assessment score was from 3.2 ( $\pm 0.83$ ) to 2.6 ( $\pm 1.5$ ). The evaluation of the growth of bacterial colonies was performed and, so far, in a sample of two bulls, an average of 57 colonies before treatment and 11.5 colonies after treatment was observed. In the analysis of sperm morphology, the bulls presented 14.6% ( $\pm 9.2$ ) of major defects and 20.6% ( $\pm 7.5$ ) of total defects before treatment and 12.3% ( $\pm 5.3$ ) of major defects and 18.5% ( $\pm 5.4$ ) of total defects after treatment. According to the data presented, we can conclude that the application of allogeneic MSCs for the treatment of vesicular adenitis in bulls has therapeutic potential because it presents an improvement in the ultrasound appearance of the glands, a decrease in the values in the CMT test and a decrease in bacterial growth after treatment.

**Keywords:** bovine, vesiculitis, treatment, stem cells

## Tratamento de disfunção epididimária em touro doador de sêmen com células tronco mesenquimais alogênicas – Relato de caso

Renata Lançoni<sup>1\*</sup>, Neimar Correa Severo<sup>1</sup>, Teresinha Inês Assumpção<sup>1</sup>, José Roberto Potiens<sup>2</sup>, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho<sup>2</sup>, Natalia Aparecida Rocha Gaudio<sup>2</sup>, Marcelo da Cunha Xavier<sup>3</sup>, Maurício Antonio Silva Peixer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Seleon Biotecnologia Animal LTDA, Itatinga, SP, Brasil

<sup>3</sup>BioCell Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

\*e-mail: renata.lanconi@ufu.br

A disfunção epididimária é caracterizada por alteração da morfologia dos espermatozoides ligada à cauda anormal, com um quadro permanente de alta incidência de caudas dobradas e gota citoplasmática proximal (GCP) ou distal. Isso pode ocorrer devido a alterações bioquímicas no líquido epididimário e tal disfunção pode ou não ter origem infecciosa. Em caso de associação com infecções, haverá concomitantemente à presença de defeitos morfológicos característicos a presença de secreção purulenta no ejaculado e presença de neutrófilos e/ou linfócitos no esfregaço corado. Diante disso, o objetivo deste resumo foi relatar o tratamento de um touro doador de sêmen com disfunção epididimária utilizando células tronco mesenquimais (CTM) alogênicas. As CTM possuem propriedades imunomoduladoras por meio da produção de citocinas atuantes no sistema inflamatório e imunológico. Sua atuação na modulação da inflamação levou com que fossem testadas neste trabalho na disfunção epididimária em touros, considerando-se a complexidade do ambiente epididimário e a potencialidade terapêutica das CTM. O touro relatado apresentava constante presença de alta porcentagem de defeitos maiores característicos de maturação epididimária, principalmente gota citoplasmática proximal, prejudicando a congelabilidade e impedindo a comercialização dos ejaculados, não foi observado quadro infeccioso associado. Foram realizadas avaliações de morfologia espermática pela técnica câmara úmida e leitura em microscópio de contraste de fase e avaliação da motilidade espermática por meio de análise computadorizada (CASA). Os dados estão apresentados de maneira descritiva como média ( $\pm$  desvio padrão). Em amostra colhida em 03/10/2022, antes da realização do tratamento, o touro apresentava 49% de defeitos maiores sendo 47% GCP e 2% defeitos de peça intermediária, 0% de defeitos menores, motilidade total 63,5% e motilidade progressiva 51,9%. O tratamento foi realizado no dia 21/10/2022, com aplicação de 3 milhões de CTM alogênicas por via subcutânea na região peri-epididimária em ambos os lados. Em seguida, o animal foi mantido em repouso sexual, fora do regime de colheitas durante 20 dias para completa ação das CTM. Nas primeiras colheitas após o tratamento (que foram realizadas nos dias 11/11/2022 e 03/01/2023), o touro ainda apresentou alta quantidade de defeitos morfológicos, com média de defeitos totais 49,5%, sendo 0,5% defeitos menores e 49% defeitos maiores (destes, 48% de GCP). Aproximadamente 70 dias após o tratamento o touro começou a apresentar consideráveis melhoras na qualidade espermática. De janeiro a abril de 2023, período em que foi avaliado apresentou 20,1% ( $\pm 5,8$ ) de defeitos maiores, 0,8% ( $\pm 1,08$ ) de defeitos menores e 21% ( $\pm 6,04$ ) de defeitos totais. Isto possibilitou o retorno da comercialização de palhetas de sêmen do animal. Até o momento, após o tratamento já foram produzidas dentro dos padrões de comercialização 5.992 doses de sêmen. Apesar deste relato incluir apenas um animal tratado, podemos concluir que as CTM possuem potencial terapêutico para disfunções epididimárias em touros, levando-se a possibilidades de estudos moleculares para entendimento de sua atuação no ambiente epididimário e ampliação do número de animais para tratamentos futuros.

**Palavras-chave:** epidídimo, morfologia espermática, terapia celular.

## Treatment of epididymal dysfunction in a semen donor bull with allogeneic mesenchymal stem cells – Case report

Renata Lançoni<sup>1\*</sup>, Neimar Correa Severo<sup>1</sup>, Teresinha Inês Assumpção<sup>1</sup>, José Roberto Potiens<sup>2</sup>, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho<sup>2</sup>, Natalia Aparecida Rocha Gaudio<sup>2</sup>, Marcelo da Cunha Xavier<sup>3</sup>, Maurício Antonio Silva Peixer<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Seleon Biotecnologia Animal LTDA, Itatinga, SP, Brasil

<sup>3</sup>BioCell Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

\*e-mail: renata.lanconi@ufu.br

Epididymal dysfunction is characterized by alteration of sperm morphology linked to abnormal tail, with a permanent picture of high incidence of bent tails and proximal or distal cytoplasmic droplet. This may occur due to biochemical changes in the epididymal fluid and such dysfunction may or may not have an infectious origin. In case of association with infections, there will be, concomitantly with the presence of characteristic morphological defects, the presence of purulent secretion in the ejaculate and the presence of neutrophils and/or lymphocytes in the stained smear. Therefore, the objective of this summary was to report the treatment of a semen donor bull with epididymal dysfunction using allogeneic mesenchymal stem cells (MSC). MSCs have immunomodulatory properties through the production of cytokines that act on the inflammatory and immune system. Their role in modulating inflammation led them to be tested in this work on epididymal dysfunction in bulls, considering the complexity of the epididymal environment and the therapeutic potential of MSCs. The reported bull had a constant presence of a high percentage of major defects characteristic of epididymal maturation, mainly proximal cytoplasmic droplet, impairing the freezability and preventing the commercialization of the ejaculates, no associated infectious condition was observed. Sperm morphology evaluations were carried out using the wet chamber technique in phase contrast microscopy and evaluation of sperm motility using computerized analysis (CASA). Data are presented descriptively as mean ( $\pm$  standard deviation). In a sample collected on 10/03/2022, before the treatment, the bull had 49% of major defects, 47% of proximal droplet and 2% of midpiece defects, 0% of minor defects, total motility 63.5% and 51.9% progressive motility. The treatment was carried out on 10/21/2022, with the application of 3 million allogeneic MSCs subcutaneously in the peri-epididymal region on both sides. Then, the animal was kept in sexual rest, outside the collection regime for 20 days for complete action of the MSCs. In the first harvests after treatment (which were carried out on 11/11/2022 and 01/03/2023), the bull still showed a high number of morphological defects, with an average of 49.5% of total defects, 0.5% of which minor defects and 49% major defects (of these, 48% proximal droplet). Approximately 70 days after treatment the bull began to show considerable improvements in sperm quality. From January to April 2023, the period in which it was evaluated, it presented 20.1% ( $\pm 5.8$ ) of major defects, 0.8% ( $\pm 1.08$ ) of minor defects and 21% ( $\pm 6.04$ ) of total defects. This made it possible to return to the sale of animal semen straws. So far, after treatment, 5,992 doses of semen have already been produced within marketing standards. Although this report includes only one treated animal, we can conclude that MSCs have therapeutic potential for epididymal disorders in bulls, leading to possibilities for molecular studies to understand their performance in the epididymal environment and increase the number of animals for future treatments.

**Keywords:** epididymis, sperm morphology, cell therapy.

## Uso do hidrolisado da clara do ovo como agente protetor contra o estresse oxidativo em células espermáticas bovinas

Rafaela Dalmolin Menezes<sup>1\*</sup>, Francielli Weber Santos Cibir<sup>1</sup>, Diogo Ferreira Bicca<sup>1</sup>, Giulia Alessandra Wiggers<sup>1</sup>, Marta Miguel Castro<sup>2</sup>, Daniela dos Santos Brum<sup>1</sup>, Fabio Leivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de biotecnologia da reprodução-BIOTECH- Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA, <sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM)  
\*e-mail: rafaelamenezes.aluno@unipampa.edu.br

Durante o processo de criopreservação do sêmen, os espermatozoides são expostos a condições extremas de baixa temperatura e alta concentração de crioprotetores, que podem causar danos às células espermáticas. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são geradas durante esse processo e, em excesso, podem levar a danos oxidativos nas células. O estresse oxidativo (EO) pode prejudicar a integridade da membrana celular dos espermatozoides, reduzindo sua motilidade e sua capacidade de fertilização. Além disso, o EO também pode levar a danos no DNA do espermatozoide, o que pode prejudicar a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Por isso, é importante que medidas de proteção antioxidante sejam adotadas durante a manipulação do sêmen, como a adição de antioxidantes aos meios de criopreservação e o uso de técnicas que minimizem o tempo de exposição dos espermatozoides a condições extremas de temperatura e concentração de crioprotetores. O hidrolisado de clara de ovo (HCO), obtido por hidrólise enzimática com pepsina por 8 horas, tem sido objeto de diversos estudos, que apontam sua alta capacidade antioxidante e anti-inflamatória em diferentes sistemas. Diante dos benefícios observados, bem como da importância do uso de antioxidantes na preservação da qualidade do espermatozoide, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante do HCO em espermatozoides bovinos na presença de menadiona (indutor de dano oxidativo). Foram realizadas quatro repetições, utilizando doses de sêmen descongelado a 37°C por 20", provenientes de quatro touros aprovados para reprodução. Em seguida, o pool de sêmen previamente avaliado foi submetido a seleção por gradientes de percoll (90% e 45%). O pellet resultante foi avaliado quanto à motilidade, motilidade progressiva, vigor e concentração. Posteriormente, o sêmen foi depositado em tubos Eppendorf de 500 µL na concentração de 4x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, contendo 350 µL de meio Fert TALP. Foram realizados diferentes tratamentos adicionando ou não 0,15 µg/mL de menadiona (M) e diferentes concentrações de HCO (fração <3KDa). Os tratamentos foram: Controle (C) - Fert TALP, Menadiona (CM) - Fert TALP + M, T1HM - Fert TALP + 50 µg/mL HCO, T2HM - Fert TALP + 1000 µg/mL HCO, T3 HM - Fert TALP + 150 µg/mL HCO e T4HM - Fert TALP + 500 µg/mL HCO. Os tubos contendo os tratamentos foram mantidos a uma temperatura de 37°C e a cinética espermática foi observada após três horas de incubação. Os parâmetros de motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), amplitude de batimento lateral de cabeça (ALH) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) foram avaliados pelo CASA (SCA®- Sperm Class Analyser; Microptic, Barcelona, Espanha). Além disso, foi avaliada produção de ERO pelo método fluorimétrico, e a capacidade antioxidante total pelo método de FRAP (ferric reducing ability of plasma). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Na cinética, o grupo CM apresentou valores significativamente menores para MP, VSL, VCL, ALH e BCF (P ≤ 0,05) em comparação ao grupo controle. Além disso, os parâmetros cinéticos foram semelhantes entre os tratamentos CM, T1, T2, T3 e T4 para MP 8,73; 10,14; 7,02; 13,71; 3,42 (%), VSL 9,21; 11,89; 9,78; 9,39; 6,17 (%), VCL 23,60; 24,92; 22,53; 21,53; 16,35 (%), ALH 0,82; 0,89; 0,76; 0,85; 0,71 (µm) e BCF 3,35; 4,21; 2,60; 2,62; 1,05 (Hz), mas diferiram (P<0,05), significativamente do grupo controle (38,58%, 37,35%, 59,55%, 1,30µm, 12,34Hz, respectivamente). Os resultados das avaliações bioquímicas não demonstraram diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos C, CM, T1, T2, T3 e T4 nos parâmetros ERO (UF) e FRAP (µg equivalentes de ácido ascórbico), com valores de 32,099; 38,021; 42,393; 40,282; 48,286; 43,803 e 653, 729, 745, 703, 701, 771, respectivamente. Isso indica que a adição de HCO em diferentes concentrações propostas neste experimento não foi eficiente para reduzir o estresse oxidativo causado pela menadiona nos parâmetros avaliados.

**Palavras-chave:** antioxidante, motilidade, espermatozoides

**Agradecimentos:** CAPES e FINEP



## Utilization of egg white hydrolysate as a protective agent against oxidative stress in bovine sperm cells

Rafaela Dalmolin Menezes<sup>1\*</sup>, Francielli Weber Santos Cibirin<sup>1</sup>, Diogo Ferreira Bicca<sup>1</sup>, Giulia Alessandra Wiggers<sup>1</sup>, Marta Miguel Castro<sup>2</sup>, Daniela dos Santos Brum<sup>1</sup>, Fabio Leivas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de biotecnologia da reprodução-BIOTECH- Universidade Federal do Pampa-UNIPAMPA, <sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL, CSIC-UAM)  
\*e-mail: rafaelamenezes.aluno@unipampa.edu.br

During the semen cryopreservation process, spermatozoa are exposed to extreme conditions of low temperature and high concentration of cryoprotectants, which can cause damage to the sperm cells. Reactive oxygen species (ROS) are generated during this process and, in excess, can lead to oxidative damage to the cells. Oxidative stress (OS) can impair the integrity of the sperm cell membrane, reducing its motility and fertilization capacity. In addition, OS can also lead to damage to the sperm DNA, which can impair fertilization and embryonic development. Therefore, it is important that antioxidant protection measures be adopted during semen manipulation, such as the addition of antioxidants to cryopreservation media and the use of techniques that minimize the time of exposure of spermatozoa to extreme conditions of temperature and cryoprotectant concentration. Egg yolk hydrolysate (EYH), obtained by enzymatic hydrolysis of egg yolk, has been the subject of several studies that point to its high antioxidant and anti-inflammatory capacity in different systems. Given the observed benefits, as well as the importance of using antioxidants in preserving sperm quality, this study aimed to evaluate the antioxidant effect of EYH in bovine sperm in the presence of menadione (inducer of oxidative damage). Four repetitions were performed using thawed semen doses at 37°C for 20", from four bulls approved for reproduction. Subsequently, the previously evaluated semen pool was subjected to selection by percoll gradients (90% and 45%). The resulting pellet was evaluated for motility, progressive motility, vigor, and concentration. Later, the semen was deposited in 500 µL Eppendorf tubes at a concentration of 4x10<sup>6</sup> spermatozoa/mL, containing 350 µL of Fert TALP medium. Different treatments were performed by adding or not 0.15 µg/mL of menadione (M) and different concentrations of EYH. The treatments were: Control (C) - Fert TALP, Menadione (CM) - Fert TALP + M, T1HM - Fert TALP + 50 µg/mL EYH, T2HM - Fert TALP + 1000 µg/mL EYH, T3 HM - Fert TALP + 150 µg/mL EYH, and T4HM - Fert TALP + 500 µg/mL EYH. The tubes containing the treatments were maintained at a temperature of 37°C and sperm kinetics were observed after three hours of incubation. The parameters of progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), lateral head beat amplitude (ALH), and cross-beat flagellar frequency (BCF) were evaluated by CASA (SCA®- Sperm Class Analyser; Microptic, Barcelona, Spain). In addition, ROS production was evaluated, and total antioxidant capacity was determined by the FRAP method (ferric reducing ability of plasma). The data obtained were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. In kinetics, the CM group presented significantly lower values for MP, VSL, VCL, ALH, and BCF ( $P \leq 0.05$ ) compared to the control group. Furthermore, the kinetic parameters were similar between the CM, T1, T2, T3, and T4 treatments for MP 8.73; 10.14; 7.02; 13.71; 3.42 (%), VSL 9.21; 11.89; 9.78; 9.39; 6.17 (%), VCL 23.60; 24.92; 22.53; 21.53; 16.35 (%), ALH 0.82; 0.89; 0.76; 0.85; 0.71 (µm) and BCF 3.35; 4.21; 2.60; 2.62; 1.05 (Hz), but differed significantly ( $P < 0.05$ ) from the control group (38.58%, 37.35%, 59.55%, 1.30µm, 12.34Hz, respectively). The results of the biochemical evaluations did not show a significant difference ( $P > 0.05$ ) among the treatments C, CM, T1, T2, T3, and T4 in the ERO (UF) and FRAP (µg equivalents of ascorbic acid) parameters, with values of 32.099; 38.021; 42.393; 40.282; 48.286; 43.803 and 653, 729, 745, 703, 701, 771, respectively. This indicates that the addition of HCO at different concentrations proposed in this experiment was not efficient in reducing oxidative stress caused by menadione in the evaluated parameters.

**Keywords:** antioxidant, motility, spermatozoa

**Acknowledgments:** CAPES and FINEP