

Ação do resfriamento testicular na cinética espermática de amostras de cervos sambar (*Rusa unicolor*) obtidas pela cauda do epidídimo.

Mateus Martins Rodrigues dos Santos*, Rodrigo Freitas Bittencourt², Antônio de Lisboa Ribeiro Filho², Isabella de Matos Brandão Carneiro³, Gleice Mendes Xavier³, Máira Planzo Fernandes³, Eduardo de Oliveira Costa³, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Amanda Íris dos Santos Correia¹, Thamys Costa¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana; ¹, Taíres dos Santos Rodrigues⁴

¹Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia - EMVZ/UFBA; ²Professor Associado da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA; ³Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos - UFBA; ⁴Programa de Residência em Reprodução animal e Obstetrícia Veterinária - UFBA
*e-mail: mateusmrs@ufba.br

A criopreservação seminal de animais silvestres é de suma importância para a preservação de espécies ameaçadas de extinção. Para garantir a viabilidade das células preservadas, é necessário analisar e padronizar as características espermáticas. O cervo Sambar é uma espécie amplamente distribuída mundialmente, mas a globalização e o desmatamento desencadeiam a fragmentação do seu habitat, que levam a riscos relacionados ao declínio em relação ao número de indivíduos e queda na variabilidade genética. Neste trabalho, foram estudados os efeitos do resfriamento do complexo testículo-epididimário em características espermáticas de cervos Sambar *ex situ*. Quatro animais identificados de 1 a 4 foram submetidos à orquiectomia eletiva, sendo que os testículos foram retirados e acondicionados em caixas térmicas e transportados imediatamente ao Laboratório de Reprodução Animal do HOSPMEV-UFBA. O testículo esquerdo foi analisado no momento da chegada (in natura), sendo utilizado como grupo controle, enquanto o testículo direito foi submetido à refrigeração em temperatura estabilizada de 5 °C por um período de 24h para posterior análise. A análise multiparamétrica foi realizada utilizando o sistema SCA® (Microoptics, Barcelona, ESP), levando em consideração os seguintes dados: Volume, vigor, eosina, MT (motilidade total), MP (motilidade progressiva), teste hiposmótico, concentração, percentual de móveis, percentual de progressivos, percentual de imóveis, velocidade curvilínea (VCL), velocidade de percurso (VAP), velocidade linear (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), índice de oscilação (WOB), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), batimento flagelar cruzado (BFC). Foi utilizado o programa estatístico (SPSS), versão 21.0 para Windows. Para testar a normalidade das amostras foi utilizado o teste de Shapiro-wilk, teste t-student para comparação de médias entre os grupos In *natura* e refrigerado e o teste de Mann-Whitney para as amostras que não apresentaram distribuição normal, com nível de significância de 5%. Os dados obtidos para as análises in natura e após resfriamento foram, respectivamente: Volume (ml) ($0,7 \pm 0,45$ e $0,48 \pm 0,45$), Vigor ($3,5 \pm 0,35$ e $3,1 \pm 0,22$), Eosina (%) ($53,8 \pm 30,71$ e $67,2 \pm 3,83$), MT(%) ($71,0 \pm 17,10$ e $64,0 \pm 15,16$), MP (%) ($46,0 \pm 17,10$ e $39,0 \pm 12,94$), HOST (%) ($68,2 \pm 10,15$ e $64,0 \pm 11,38$), Concentração (milhões/ml) ($789,0 \pm 558,73$ e $755,4 \pm 510,2$), Percentual de móveis ($51,62 \pm 20,4$ e $59,60 \pm 6,6$), Percentual de progressivos ($37,7375 \pm 20,38$ e $42,5275 \pm 9,33$), Percentual de imóveis ($48,3575 \pm 20,34$ e $40,4000 \pm 6,51$), VCL($\mu\text{m}/\text{seg}$) ($107,8650 \pm 18,66$ e $108,0900 \pm 12,04$), VAP ($\mu\text{m}/\text{seg}$) ($59,9000 \pm 13,19$ e $62,1525 \pm 13,67$), VSL($\mu\text{m}/\text{seg}$) ($31,3625 \pm 6,52$ e $30,8325 \pm 11,32$), STR (%) ($54,41 \pm 9,1$ e $51,58 \pm 7,7$), LIN (%) ($32,0300 \pm 8,39$ e $31,8050 \pm 8,07$), WOB (%) ($56,3025 \pm 5,5$ e $57,7050 \pm 6,7$), ALH (μm) ($4,3950 \pm 0,76$ e $4,2275 \pm 0,25$), BFC (Hz) ($289,7775 \pm 562,81$ e $8,9650 \pm 0,81$). Não foram observadas diferença estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos in natura e refrigerado, evidenciando que não há interferência do resfriamento em 24 horas nos parâmetros de cinética e viabilidade espermática no sêmen do cervo Sambar.

Palavras-chave: Criopreservação, Espermograma, Sêmen.

The effect of testicular cooling on sperm samples kinetics of sambar deer (*Rusa unicolor*) obtained from epididymal tail

Mateus Martins Rodrigues dos Santos*, Rodrigo Freitas Bittencourt², Antônio de Lisboa Ribeiro Filho², Isabella de Matos Brandão Carneiro³, Gleice Mendes Xavier³, Máira Planzo Fernandes³, Eduardo de Oliveira Costa³, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Amanda Íris dos Santos Correia¹, Thamys Costa¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana; ¹, Taires dos Santos Rodrigues⁴

¹Estágio no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia - EMVZ/UFBA; ²Professor Associado da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA; ³Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Tópicos - UFBA; ⁴Programa de Residência em Reprodução animal e Obstetrícia Veterinária - UFBA

*e-mail: mateusmrs@ufba.br

The seminal cryopreservation of wildlife animals is of paramount importance for the preservation of endangered species. To ensure the viability of preserved cells, it is necessary to analyze and standardize sperm characteristics. The Sambar deer is a species widely distributed worldwide, but globalization and deforestation trigger habitat fragmentation, leading to risks associated with the decline in the number of individuals and a decrease in genetic variability. In this study, the effects of cooling the testis-epididymis complex on sperm characteristics of ex situ Sambar deer were investigated. Four identified animals (1 to 4) underwent elective orchiectomy, with the testicles being removed, placed in thermal boxes and immediately transported to the Animal Reproduction Laboratory of HOSPMEV-UFBA. The left testicle was analyzed upon arrival (in natura) and used as the control group, while the right testicle was subjected to cooling at a stabilized temperature of 5 °C for a period of 24 hours for subsequent analysis. Multiparametric analysis was performed using the SCA[®] system (Microoptics, Barcelona, ESP), taking into account the following parameters: volume, vigor, eosin, total motility (TM), progressive motility (PM), hypo-osmotic swelling test, concentration, percentage of motile sperm, percentage of progressive sperm, percentage of immotile sperm, curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), straightness (STR), linearity (LIN), wobble (WOB), amplitude of lateral head displacement (ALH), and beat cross frequency (BCF). The statistical software SPSS, version 21.0 for Windows, was used for analysis. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of the samples, the t-test was employed to compare means between the in natura and cooled groups, and the Mann-Whitney test was used for samples that did not follow a normal distribution, with a significance level of 5%. The obtained data for the in natura and cooled analyses were respectively: Volume (ml) (0.7 ± 0.45 and 0.48 ± 0.45), Vigor (3.5 ± 0.35 and 3.1 ± 0.22), Eosin (%) (53.8 ± 30.71 and 67.2 ± 3.83), MT (%) (71.0 ± 17.10 and 64.0 ± 15.16), MP (%) (46.0 ± 17.10 and 39.0 ± 12.94), HOST (%) (68.2 ± 10.15 and 64.0 ± 11.38), Concentration (million/ml) (789.0 ± 558.73 and 755.4 ± 510.2), Percent motility (51.62 ± 20.4 and 59.60 ± 6.6), Progressive motility (%) (37.7375 ± 20.38 and 42.5275 ± 9.33), Non-progressive motility (%) (48.3575 ± 20.34 and 40.4000 ± 6.51), VCL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) (107.8650 ± 18.66 and 108.0900 ± 12.04), VAP ($\mu\text{m}/\text{sec}$) (59.9000 ± 13.19 and 62.1525 ± 13.67), VSL ($\mu\text{m}/\text{sec}$) (31.3625 ± 6.52 and 30.8325 ± 11.32), STR (%) (54.41 ± 9.1 and 51.58 ± 7.7), LIN (%) (32.0300 ± 8.39 and 31.8050 ± 8.07), WOB (%) (56.3025 ± 5.5 and 57.7050 ± 6.7), ALH (μm) (4.3950 ± 0.76 and 4.2275 ± 0.25), BFC (Hz) (289.7775 ± 562.81 and 8.9650 ± 0.81). No statistical differences were observed ($P < 0.05$) between the in natura and 24h refrigerated groups, indicating that there is no interference of cooling on the kinetic and sperm viability parameters in Sambar deer semen in this period of time.

Keywords: Cryopreservation, Spermogram, Semen.

Análise retrospectiva dos parâmetros espermáticos em ejaculados de catetos apresentando congelabilidade contrastante

Jane Cleide Jenuário Martins^{1*}, Samara Sandy Jerônimo Moreira¹, Ana Glória Pereira¹, Thales Pinheiro Cavalcante², Náyra Rachel Nascimento Luz¹, Tainá Moura Matos¹, Yuri Gonçalves Matos¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratório de Germoplasma Animal (LCGA), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

²Curso de Graduação em Medicina Veterinária, UNIFOR, Fortaleza, CE, Brasil

*e-mail: jane.martins@alunos.ufersa.edu.br

O cateto (*Pecari tajacu*) é considerado um indicador de qualidade ambiental, pois por apresentar grande tolerância a ambientes alterados; desse modo, sua ausência pode apontar degradação ambiental. Dada sua importância ecológica, diversas estratégias para a sua conservação têm sido desenvolvidas, como a criopreservação de germoplasma masculino. Neste contexto, já se sabe os efeitos negativos do processo de congelamento/descongelamento sobre os parâmetros de qualidade do espermatozoide, no entanto, estudos comprovam que esses efeitos também podem ocorrer por características inerentes ao próprio indivíduo. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo identificar se tal espécie apresenta características espermáticas no ejaculado a fresco que permitam prever sua congelabilidade contrastante. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFERSA (nº 05/2020). Foram utilizados 26 machos adultos oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS - UFERSA), com idade média de 40 meses. Para a coleta, os animais foram contidos e anestesiados com propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brasil) em bolus de 5 mg/kg por via intravenosa. A coleta ocorreu por meio da eletroejaculação utilizando um protocolo previamente estabelecido para a espécie. Após a obtenção do sêmen, uma alíquota da amostra fresca foi imediatamente avaliada, enquanto outra alíquota foi diluída no diluente Tris-gema- glicerol e criopreservada. Amostras frescas e congeladas/descongeladas foram avaliadas quanto aos parâmetros cinemáticos do espermatozoide (análise computadorizada de sêmen, IVOS 7.4 G; Hamilton-Thorne Research Beverly, MA, USA), integridade da membrana, atividade mitocondrial (combinações de sondas fluorescentes, Hoechst 342, Mito Tracker red® e Propidium Iodide), funcionalidade da membrana (teste hiposmótico usando água destilada – 0 mOsm/L), morfologia e morfometria espermáticas (coloração Rosa de Bengala) e capacidade de ligação do espermatozoide (teste de ligação por membrana perivitelina do ovo de galinha). Com base na motilidade pós descongelamento, os animais foram classificados como congeladores bons (> 40% de espermatozoides móveis), moderados (de 30% a 40% de espermatozoides móveis) ou ruins (< 30% de espermatozoides móveis). Com isso, foi realizado um estudo retrospectivo de ejaculados frescos, no qual foi realizada uma reclassificação das amostras de acordo com os grupos obtidos após a descongelamento. Os dados foram comparados por ANOVA univariada seguida do teste de Tukey ($P < 0,05$). Com base na motilidade pós-descongelamento determinada pelo CASA, sete indivíduos foram classificados como bons congeladores, dez como moderados e nove como ruins. Certamente, os maiores ($P < 0,05$) valores de motilidade espermática pós-descongelamento foram encontrados para os bons congeladores ($50,1 \pm 3,3\%$), em comparação aos moderados ($35,0 \pm 1,0\%$) e ruins ($18,3 \pm 1,6\%$). Na análise retrospectiva dos ejaculados a fresco, não foram verificadas diferenças significativas entre os três grupos quanto à maioria das características avaliadas (parâmetros cinemáticos, atividade mitocondrial, funcionalidade da membrana, morfologia, e capacidade ligante). No entanto, os animais classificados como congeladores ruins apresentaram o menor ($P < 0,05$) percentual de espermatozoides com membrana intacta ($77,3 \pm 1,7\%$) em relação aos bons ($84,7 \pm 3,1\%$) e moderados ($86,4 \pm 2,1\%$). Com relação à morfometria espermática, não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao comprimento da cabeça e da peça intermediária, porém, os congeladores ruins também apresentaram o menor ($P < 0,05$) comprimento de cauda ($26,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$) quando comparados aos moderados ($38,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$) e bons congeladores ($36,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$). Com base nesses resultados, pode-se inferir que a integridade da membrana espermática em ejaculados frescos pode ser utilizada como um parâmetro preditivo da congelabilidade em catetos. Além disso, a morfometria espermática, principalmente relacionada à cauda, parece também variar entre indivíduos de congelabilidade contrastante. Estas informações serão úteis para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen da espécie, contribuindo na formação de biobancos para sua conservação.

Palavras-Chaves: Biobancos; Conservação; Germoplasma; Tayassuidae.

Retrospective analysis of sperm parameters in fresh ejaculates of collared peccaries showing contrasting freezability

Jane Cleide Jenuario Martins^{1*}, Samara Sandy Jerônimo Moreira¹, Ana Glória Pereira¹, Thales Pinheiro Cavalcante², Náyra Rachel Nascimento Luz¹, Tayná Moura Matos¹, Yuri Gonçalves Matos¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation, (LAGC), UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

²Undergraduate Course in Veterinary Medicine, UNIFOR, Fortaleza, CE, Brazil

*e-mail: jane.martins@alunos.ufersa.edu.br

The collared peccary (*Pecari tajacu*) is considered an indicator of environmental quality, as it has great tolerance to altered environments; thus, its absence can indicate environmental degradation. Given its ecological importance, several strategies for its conservation have been developed, such as the cryopreservation of male germplasm. In this context, the negative effects of the freezing/thawing process on sperm quality parameters are already known, however, studies show that these effects can also occur due to inherent characteristics of the individual. Thus, the present work aims to identify whether this species has sperm characteristics in the fresh ejaculate that allow predicting its contrasting freezability. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee of UFERSA (n° 05/2020). Twenty-six adult males from the Wild Animal Multiplication Center (CEMAS - UFERSA), with an average age of 40 months, were used. For collection, the animals were restrained and anesthetized with propofol (Propovan®, Cristália, Fortaleza, Brazil) in an intravenous bolus of 5 mg/kg. The collection occurred through electroejaculation using a protocol previously established for the species. After obtaining the semen, an aliquot of the fresh sample was immediately evaluated, while another aliquot was diluted in Tris-yolk-glycerol diluent and cryopreserved. Fresh and frozen/thawed samples were evaluated for sperm kinematic parameters (computerized semen analysis, IVOS 7.4 G; Hamilton-Thorne Research Beverly, MA, USA), membrane integrity, mitochondrial activity (combinations of fluorescent probes, Hoechst 342, Mito Tracker red® and Propidium Iodide), membrane functionality (hyosmotic test using distilled water – 0 mOsm/L), sperm morphology and morphometry (Rose Bengal staining) and sperm binding capacity (egg perivitelline membrane binding test of chicken). Based on post-thaw motility, animals were classified as good (> 40% motile sperm), moderate (30% to 40% motile sperm) or poor freezers (< 30% motile sperm). With this, a retrospective study of fresh ejaculates was carried out, in which a reclassification of the samples was performed according to the groups obtained after thawing. Data were compared by univariate ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$). Based on post-thaw motility determined by CASA, seven individuals were classified as good freezers, ten as moderate and nine as poor. Certainly, the highest ($P < 0.05$) post-thawing sperm motility values were found for the good freezers ($50.1 \pm 3.3\%$), compared to the moderate ($35.0 \pm 1.0\%$) and bad ones ($18.3 \pm 1.6\%$). In the retrospective analysis of fresh ejaculates, no significant differences were found between the three groups regarding most of the evaluated characteristics (sperm kinematic parameters, mitochondrial activity, membrane functionality, sperm morphology and binding capacity). However, animals classified as bad freezers had the lowest ($P < 0.05$) percentage of spermatozoa with intact membrane ($77.3 \pm 1.7\%$) compared to good ($84.7 \pm 3.1\%$) and moderate ($86.4 \pm 2.1\%$) sperm. Regarding sperm morphometry, there was no statistical difference between the groups regarding the length of the head and midpiece, however, the bad freezers also had the lowest ($P < 0.05$) tail length ($26.2 \pm 0.3 \mu\text{m}$) when compared to moderate ($38.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$) and good freezers ($36.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$). Based on these results, it can be inferred that the integrity of the spermatid membrane in fresh ejaculates can be used as a predictive parameter of freezability in collared peccaries. Furthermore, sperm morphometry, mainly related to the tail, also seems to vary between individuals of contrasting freezability. This information will be useful for the improvement of the species' semen cryopreservation protocols, contributing to the formation of biobanks for its conservation.

Keywords: Biobanks; Conservation; Germplasm; Tayassuidae.

Associação entre índice gonadossomático e características seminais em felídeos neotropicais gato maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) e onça-pintada (*Panthera onca*)

Gleice Mendes Xavier^{1*}, Mônica Madrigal-Valverde², Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Maira Planzo Fernandes¹, Amanda Íris dos Santos Correia^{1*}, Thamys Costa¹, Mateus Martins Rodrigues dos Santos¹, Miguel Ferreira Bomfim Baptista¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

²Escola de Agronomia, CTLSC, Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica

*e-mail: gleicemxavier@hotmail.com

Devido a listagem de algumas espécies de felídeos silvestres na lista de animais ameaçados de extinção em situação de vulnerabilidade (VU) ou em perigo de extinção (EN), sendo eles: gato-mourisco (VU) (*Puma yagouaroundi*, É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803), gato-palheiro (VU) (*Leopardus colocolo*, Molina, 1782), gato-do-mato-grande (VU) (*Leopardus geoffroyi*, d'Orbigny & Gervais, 1844), gato-do-mato (VU) (*Leopardus guttulus*, Hensel, 1872), gato-do-mato-pequeno (EN) (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775), gato maracajá (VU) (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821) e onça-pintada (VU) (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758), o número de pesquisas envolvendo a preservação da espécie vem aumentando, com o objetivo de aumentar a população de animais, evitando a extinção desses. As biotecnologias reprodutivas surgem como uma ferramenta, já que auxiliam na preservação das espécies por meio de programas de reprodução assistida. Ao selecionar animais para participarem desses programas, é importante levar em consideração os aspectos físicos e fisiológicos dos indivíduos avaliados, assim o conhecimento da biometria corporal, testicular avaliando a sua correlação com os parâmetros seminais podem fornecer informações importantes para uma seleção mais precisa de machos aptos a participarem de programas de reprodução assistida. Assim, objetivou-se avaliar a associação entre o índice gonadossomático (IG) e as características seminais de felídeos neotropicais, por meio de diferentes métodos. Foram utilizados três machos adultos das seguintes espécies: um gato maracajá (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821), um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*, É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) e uma onça-pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) criados em recintos para conservação *ex situ*, em que o comprimento, largura e espessura testicular foram medidos pelo método do paquímetro digital (LT-4237-000 Electronic Digital Caliper) e ultrassom Mylab Five – (Grupo Esaote, Barcelona, Espanha) com transdutor linear no modo trapezoidal, com uma frequência de 5MHz). Com as medidas testiculares, foi possível estimar volume e peso testicular nos diferentes métodos de mensuração, com obtenção do peso testicular e com peso total do felino foi estimado o índice de massa do animal alocado na gônada – Índice Gonadossomático (IG) para as mensurações realizadas pelo paquímetro (IGPAQ) e ultrassom (IGUS). A coleta seminal foi realizada com aplicação de agonista alfa-2 adrenérgico (cloridrato de medetomidina (0,1 mg/kg) associada a cetamina (5 mg/kg)) e cateterismo uretral. Os parâmetros espermáticos foram avaliados por meio da análise subjetiva, quanto ao volume, vigor espermático, motilidade total, motilidade progressiva, concentração espermática, integridade estrutural (EOS) e funcional da membrana plasmática (HOST) e morfologia espermática. As análises dos dados foram realizadas com o software Statistical Package for Social Science (SPSS, versão 13.0), em que, todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, seguida pelo teste de “T”, objetivando verificar ocorrência de diferença de médias ($P < 0,05$) entre os métodos. A associação entre índice gonadossomático e as características seminais foram avaliadas pelo teste de correlação de Pearson. Não houve diferença significativa entre o IGPAQ ($0,10 \pm 0,01$) e IGUS ($0,123 \pm 0,02$) $P > 0,05$, sugerindo que as medidas obtidas a partir de instrumentos manuais ou ultrassonográficos, não influencia na obtenção do IG. Verificou-se correlações negativa entre a concentração espermática por mililitro e o IGPAQ e IGUS ($r = -1,000$, $P > 0,01$), o que significa que quanto maior for o IG menor será a concentração espermática. Espera-se que o IG tenha uma correlação positiva com a concentração espermática, pois quanto maior a massa gonadal em relação à corpórea, maior a produção de células. Porém, os resultados observados neste estudo demonstraram a ocorrência de correlação negativa entre IG e concentração espermática, o que as condições de criação desses animais podem ter influenciado em seus parâmetros espermáticos. Como é conhecido existe um efeito negativo das condições de criação *ex situ*, como estresse e alimentação, sobre a espermatogênese, sugere-se que este fator tenha contribuído com a correlação negativa entre o IG e concentração espermática, encontrada neste estudo já que os animais utilizados apresentavam condições de criação *ex situ*.

Palavras-chave: Biometria testicular, Parâmetros espermáticos, Ejaculação química.

Association between gonadosomatic index and seminal characteristics in Neotropical felids margay (*Leopardus wiedii*), moorish cat (*Puma yagouaroundi*) and jaguar (*Panthera onca*)

Gleice Mendes Xavier^{1*}, Mónica Madrigal-Valverde², Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Maíra Planzo Fernandes¹, Amanda Íris dos Santos Correia^{1*}, Thamys Costa¹, Mateus Martins Rodrigues dos Santos¹, Miguel Ferreira Bomfim Baptista¹, Elisa Lacerda d' Afonseca Santana¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Animal Reproduction and Veterinary Obstetrics Sector, Department of Anatomy, Pathologies and Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Bahia, Salvador, BA, Brazil

²School of Agronomy, CTLSC, Technological Institute of Costa Rica, San Carlos, Costa Rica

*Email: gleicemxavier@hotmail.com

Due to the listing of some species of wild felines in the list of endangered animals in a situation of vulnerability (VU) or in danger of extinction (EN), namely: Moorish cat (VU) (*Puma yagouaroundi*, É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803), wild cat (VU) (*Leopardus colocolo*, Molina, 1782), wild tawny cat (VU) (*Leopardus geoffroyi*, d'Orbigny & Gervais, 1844), tawny cat (VU) (*Leopardus guttulus*, Hensel, 1872), small wild cat (EN) (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775), margay (VU) (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821) and jaguar (VU) (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758), the number of research involving the preservation of the species has been increasing, with the objective of increasing the population of animals, avoiding their extinction. Reproductive biotechnologies emerge as a tool, as they help in the preservation of species through assisted reproduction programs. When selecting animals to participate in these programs, it is important to take into account the physical and physiological aspects of the evaluated individuals, so the knowledge of body and testicular biometry, evaluating its correlation with seminal parameters, can provide important information for a more accurate selection of suitable males. To participate in assisted reproduction programs. Thus, the objective was to evaluate the association between the gonadosomatic index (GI) and the seminal characteristics of neotropical felids, using different methods. Three adult males of the following species were used: a margay (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821), a Moorish cat (*Puma yagouaroundi*, É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) and a jaguar (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) reared in enclosures for ex situ conservation, in which testicular length, width and thickness were measured using the digital caliper method (LT-4237-000 Electronic Digital Caliper) and ultrasound Mylab Five – (Esaote Group, Barcelona, Spain) with transducer linear in trapezoidal mode, with a frequency of 5MHz). With the testicular measurements, it was possible to estimate testicular volume and weight in the different measurement methods, obtaining the testicular weight and with the total weight of the feline, the mass index of the animal allocated in the gonad was estimated - Gonadosomatic Index (GI) for the measurements performed by caliper (GIC) and ultrasound (GIUS). Seminal collection was performed with the application of an alpha-2 adrenergic agonist (medetomidine hydrochloride (0.1 mg/kg) associated with ketamine (5 mg/kg)) and urethral catheterization. Sperm parameters were evaluated through subjective analysis, regarding volume, sperm vigor, total motility, progressive motility, sperm concentration, structural integrity (EOS) and functional integrity of the plasma membrane (HOST) and sperm morphology. Data analyzes were performed using the Statistical Package for Social Science software (SPSS, version 13.0), in which all variables were submitted to the Shapiro-Wilk normality test, followed by the “T” test, aiming to verify the occurrence of difference of means ($P < 0.05$) between methods. The association between gonadosomatic index and seminal characteristics was evaluated by Pearson's correlation test. There was no significant difference between GIC (0.10 ± 0.01) and GIUS (0.123 ± 0.02) $P > 0.05$, suggesting that the measurements obtained from manual or ultrasound instruments do not influence in obtaining the GI. Negative correlations were found between sperm concentration per milliliter and GIC and GIUS ($r = -1.000$, $P > 0.01$), which means that the higher the IG, the lower the sperm concentration. It is expected that the GI has a positive correlation with sperm concentration, because the greater the gonadal mass in relation to the body mass, the greater the cell production. However, the results observed in this study demonstrated the occurrence of a negative correlation between GI and sperm concentration, which the conditions of creation of these animals may have influenced their sperm parameters. As it is known there is a negative effect of ex situ rearing conditions, such as stress and food, on spermatogenesis, it is suggested that this factor has contributed to the negative correlation between GI and sperm concentration found in this study since the animals used presented ex situ breeding conditions.

Keywords: Testicular biometry, Sperm parameters, Chemical ejaculation.

Caracterização morfológica dos espermatozoides de jabuti-piranga *Chelonoidis carbonaria* Spix, 1824

Teresinha Inês de Assumpção^{1*}, Igor Carrijo Fernandes de Araújo², André Luiz Quagliatto Santos²

¹ Laboratório de Reprodução Animal, ² Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG
*e-mail: teassumpcao@ufu.br

Os quelônios são répteis que apresentam boa capacidade de viver longos anos, sendo que as espécies do gênero *Chelonoidis* ocorrem em toda América do Sul. O jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria* Spix, 1824) é considerado o quelônio mais criado em cativeiro, porém pouco se conhece sobre sua reprodução e as pesquisas são escassas sobre as características de suas células espermáticas. O objetivo deste estudo foi avaliar a morfologia dos espermatozoides e suas anormalidades em jabuti-piranga. Foram utilizadas amostras de sêmen de nove animais coletadas anteriormente em outras pesquisas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG. Foi analisada a conformação do espermatozoide por fotomicrografias que foram obtidas em um microscópio Leica DM500 e a análise das imagens capturadas (47 células espermáticas) foi realizada no *software* “*open source*” Image J, para obter informações relativas as dimensões de comprimento total, da cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides. A morfologia espermática foi avaliada pelo método de preparação em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase verificando os defeitos apresentados pelos espermatozoides. Também foram feitos esfregaços do sêmen coradas pelo Vermelho Congo (Cеровsky). Os dados foram apresentados de forma descritiva. Os espermatozoides de jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) mostraram um formato filiforme, com cabeça alongada e em forma de S, característica semelhante a outros répteis como as serpentes, as tartarugas, os crocodilos e os jacarés. As dimensões médias de comprimento encontradas nos espermatozoides foram: cabeça $15,91 \pm 0,89 \mu\text{m}$; peça intermediária, $4,64 \pm 0,32 \mu\text{m}$; e cauda $47,56 \pm 1,61 \mu\text{m}$; sendo que o comprimento total médio encontrado foi de $68,12 \pm 1,74 \mu\text{m}$. Um total de anormalidades dos espermatozoides de $25,44 \pm 8,68 \%$ foram observadas no estudo, sendo verificadas 05 tipos de anormalidades, sendo elas: contorno anormal da cabeça $10,0 \pm 2,87 \%$, defeito de peça intermediária $11,11 \pm 2,26 \%$, cauda dobrada $1,78 \pm 1,30 \%$, cauda enrolada $1,0 \pm 1,12 \%$ e cabeça isolada normal $1,56 \pm 1,13 \%$. A morfologia dos espermatozoides em jabuti-piranga (*Chelonoidis carbonaria*) é semelhante à de outros répteis e o sêmen demonstrou boa qualidade morfológica, com poucos tipos de anormalidades celulares. Existem poucos relatos sobre a reprodução de jabutis e os parâmetros reprodutivos para a espécie ainda não foram definidos. Ainda são necessários mais estudos sobre a reprodução destes répteis, a fim de contribuir para a sua conservação e preservação.

Palavras-chave: reprodução; sêmen; répteis; quelônios

Morphological characterization of the red-footed tortoise spermatozoa, *Chelonoidis carbonaria*, Spix 1824

Teresinha Inês de Assumpção^{1*}, Igor Carrijo Fernandes de Araújo², André Luiz Quagliatto Santos²

¹Laboratório de Reprodução Animal, ²Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres
Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG
*e-mail: teassumpcao@ufu.br

Chelonians are reptiles that has a good capacity to live for long years, this specie belongs to genus *Chelonoidis* and occur throughout South America. Red-footed tortoise (*Chelonoidis carbonaria* Spix, 1824) is considered the most bred chelonian in captivity, but little is known about its reproduction and research is scarce about the characteristics of its sperm cells. The aim of this study was to evaluate sperm morphology and its abnormalities in red-footed tortoise. Semen samples from nine animals previously collected in other studies at the Teaching and Research Laboratory in Wild Animals at the Federal University of Uberlandia were used. The sperm conformation was analyzed by photomicrographs that were obtained in a Leica DM500 microscope and the analysis of the captured images (47 sperm cells) was performed in the “open source” software Image J, to obtain information regarding the dimensions of total length, head, middle piece and tail of sperm. Sperm morphology was evaluated by in a humidity chamber method by phase-contrast microscopy, verifying the defects presented by the spermatozoa. Semen smears stained with Congo Red (Cerovsky) were also made. Data were presented descriptively. The sperm of red-footed tortoise (*Chelonoidis carbonaria*) showed a filiform shape, with an elongated and S-shaped head, a characteristic similar to other reptiles such as snakes, turtles, crocodiles and alligators. The average dimensions in length found for the spermatozoa were: head $15.91 \pm 0.89 \mu\text{m}$; middle piece $4.64 \pm 0.32 \mu\text{m}$; tail $47.56 \pm 1.61 \mu\text{m}$; and the total length found was $68.12 \pm 1.74 \mu\text{m}$. A total of sperm abnormalities of $25.44 \pm 8.68 \%$ were observed in the study, being verified 05 types of abnormalities, namely: abnormal head shape $10.0 \pm 2.87 \%$, Midpiece defect $11.11 \pm 2.26 \%$, folded tail $1.78 \pm 1.30 \%$, coiled tail $1.0 \pm 1.12 \%$ and normal isolated head $1.56 \pm 1.13 \%$. The morphology of sperm in red-footed tortoise (*Chelonoidis carbonaria*) is similar other reptiles and the semen showed good morphological quality, with few types of cellular abnormalities. There are few reports on the reproduction of tortoises and the reproductive parameters for the species have not yet been defined. More studies are still needed on the reproduction of these reptiles to contribute to their conservation and preservation.

Keywords: reproduction; sperm; reptiles; chelonians.

Coleta e avaliação do sêmen de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*, Müller & Henle, 1841)

Laura de Oliveira Camilo¹, Eduardo Gomes Sanches², Hugo Gallo Neto¹, Carlos Eduardo Malavasi Bruno³,
Silvia Edelweiss Crusco^{4*}

¹Aquário de Ubatuba – Ubatuba – São Paulo – Brasil, ²Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte - Instituto de Pesca – Ubatuba – São Paulo – Brasil, ³Laboratório de Pescado e Sanidade do Pescado, Universidade Federal Fluminense (UFF)- Faculdade de Medicina Veterinária – Niterói – Rio de Janeiro – Brasil, ⁴Mirai Centro de Diagnóstico Veterinário – Vargem Grande Paulista – São Paulo – Brasil

*e-mail: silviacrusco@terra.com.br

As raia compõem a superordem Batoidea que integra a subclasse dos elasmobrânquios e estão entre os vertebrados de maior sucesso evolutivo. A *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841), conhecida popularmente como raia-viola-de-focinho-curto ou raia-viola-de-cara-curta, é uma espécie de raia marinha da ordem Rhinoprístiformes e da família Trygonorrhinidae. O objetivo deste trabalho foi desenvolver a coleta e análise de sêmen de raia-viola-de-focinho-curto. Foram utilizados dois machos adultos provenientes do Aquário de Ubatuba – SP. Para a colheita do sêmen, o macho foi retirado do tanque e mantido em uma caixa plástica de 540 mm comprimento x 330 mm largura x 120 mm de altura, contendo 10 L de água do aquário de origem e provida de aeração. A cloaca foi emergida e seca com papel toalha. Foi realizada uma pressão bilateral na região abdominal lateralmente à cloaca, onde se situa a papila urogenital, sobre a vesícula seminal, essa pressão foi suficiente para fazer o sêmen fluir pela cloaca. O sêmen foi colhido diretamente em tubos cônicos graduados, fabricados em polipropileno. Imediatamente após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto aos parâmetros macroscópicos (coloração, aspecto e volume) e microscópicos (motilidade, vigor e morfologia espermática). Vinte microlitros de sêmen foram alocados entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C e observados em microscopia óptica (Microscópio Binocular - N 107 Coleman®) para validação da presença dos espermatozoides, assim como a mensuração da motilidade e vigor espermáticos. Foram utilizados aumentos de 40x, 100x e 400x. O sêmen foi diluído 1:200 e o cálculo da concentração espermática foi feito por câmara de Neubauer. A análise da morfologia espermática se deu através de duas metodologias distintas: (1) esfregaço do sêmen corado com a coloração Panótico Rápido® e (2) preparação em câmara úmida, com diluição 1:20 em formol salina. Foram coletados ejaculados de dois machos. As amostras apresentaram os seguintes parâmetros seminais: coloração marfim, aspecto cremoso, volume total médio de 0,9 mL. Durante a observação do sêmen na microscopia óptica, notou-se que muitos dos espermatozoides estavam fortemente empacotados (agrupados) na região da porção cefálica (cabeça). Não foi possível determinar com precisão a motilidade progressiva espermática devido à presença concomitante de pacotes de espermatozoides e espermatozoides livres, sendo possível identificar a motilidade espermática no sêmen fresco (*in natura*). Os espermatozoides que estavam livres tinham a aparência filiforme helicoidal. A concentração média dos espermatozoides foi realizada em câmara de Neubauer e resultou no total de 5 milhões de pacotes por mL e 140 milhões de espermatozoides livres por mL. Foi possível a identificação da morfologia espermática com a coloração Panótico Rápido® e também em lâmina úmida. Foram visualizados os pacotes de espermatozoides, os espermatozoides individualmente com a distinção da porção cefálica (ou cabeça), a peça intermediária e a cauda (ou flagelo). Esta foi uma primeira descrição da coleta e análise de sêmen de raia-viola-de-focinho-curto (*Zapteryx brevirostris*).

Palavras-chave: raia-viola-de-focinho-curto, conservação; elasmobrânquios, sêmen, reprodução

Este estudo foi legalmente sustentado pela Autorização de Uso e Manejo SMA/SP AM2856440 e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Aquário de Ubatuba (nº. 04/2021).

Semen collection and evaluation of shortnose guitarfish (*Zapteryx brevirostris*, Müller & Henle, 1841)

Laura de Oliveira Camilo¹, Eduardo Gomes Sanches², Hugo Gallo Neto¹, Carlos Eduardo Malavasi Bruno³,
Silvia Edelweiss Crusco^{4*}

¹Aquário de Ubatuba – Ubatuba – São Paulo – Brazil, ²Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento do Litoral Norte - Instituto de Pesca – Ubatuba – São Paulo – Brasil, ³Laboratório de Pescado e Sanidade do Pescado, Universidade Federal Fluminense (UFF)- Faculdade de Medicina Veterinária – Niterói – Rio de Janeiro – Brasil, ⁴Mirai Centro de Diagnóstico Veterinário – Vargem Grande Paulista – São Paulo – Brasil

*e-mail: silviacrusco@terra.com.br

Rays make up the superorder Batoidea, which is part of the subclass of elasmobranchs and is among the most evolutionarily successful vertebrates. *Zapteryx brevirostris* (Müller & Henle, 1841), popularly known as the shortnose guitarfish (*Zapteryx brevirostris*), is a species of sea ray in the order Rhinopristiformes and family Trygonorrhinidae. The aim of this study was to standardize the collection and evaluation of semen of the shortnose guitarfish. Were used two males from the Ubatuba Aquarium – SP. To semen collection, males were removed from the tank and kept in a plastic box of 540 mm length x 330 mm width x 120 mm height, containing 10 L of water from the aquarium of origin, and provided with aeration. The cloaca was emerged and dried with paper towels. A bilateral pressure in the abdominal region laterally to the cloaca, on the seminal vesicle, was enough to make the sperm flow through the cloaca. The semen was collected directly in graduated conic tubes, made of polypropylene, with a capacity of 15 mL. Immediately after collection, semen was evaluated for macroscopic (color, appearance, and volume) and microscopic (sperm motility, vigor, and sperm morphology) parameters. A 20 µL drop of semen were allocated between slide and coverslip preheated to 37° C and observed under light microscopy (Binocular Microscope - N 107 Coleman®), for validation of the presence of spermatozoa, as well as the measurement of sperm motility and vigor. Magnification of 40x, 100x and 400x were used. Semen was diluted 1:200 and sperm concentration were calculated in the Neubauer chamber. The analysis of sperm morphology was performed through two different methodologies: (1) smear of semen stained with Rapid Panotic® staining and (2) preparation in a humid chamber, with dilution 1:20 in saline formaldehyde. Ejaculates were collected from two males. The samples presented the following seminal parameters: ivory color, creamy aspect, total media volume of 0.9 mL. During the observation of semen on light microscopy, it was noted that many of the sperm were tightly packed (clustered) in the region of the cephalic portion (head). It was not possible to accurately determine progressive sperm motility due to the concomitant presence of sperm packets and free sperm. But it was possible to observe that the sperm were in a mobile state in fresh (*in natura*) semen. The sperm that were free had the helical filiform appearance. The average sperm concentration counted in a Neubauer chamber resulted in 5 million packets per mL and 140 million sperm per mL. It was possible to identify the morphology with the Rapid Panotic® stain and moist slide, being visualized the sperm packets, they loosened with the distinction of the cephalic portion (or head), the intermediate piece and the tail (or flagellum). This was a first description of the collection and analysis of semen of the short-snouted viola ray (*Zapteryx brevirostris*).

Keywords: shortnose guitarfish, conservation, elasmobranchs, semen, reproduction

This study was legally supported by the Authorization of Use and Management SMA/SP AM2856440 and by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Ubatuba Aquarium (n°. 04/2021).

Conservação de tecido testicular de catetos pré-púberes utilizando diferentes métodos de criopreservação

Ana Glória Pereira^{1*}, Arthur Emmanuel de Araújo Lago¹, Yuri Gonçalves Matos¹, Jane Cleide Jenuário Martins¹, Andréia Maria da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹; Tayná Moura Matos¹, Andreza Vieira Brasil¹, Yasmim Carla da Silva Cavalcante¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratório de Germoplasma Animal (LCGA), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil
*e-mail: anagloriavet@gmail.com

Em diferentes biomas, a população de catetos (*Pecari tajacu*) tem sofrido um marcado declínio, sendo já considerada criticamente ameaçada na Mata Atlântica e Caatinga. Diante disso, estudos para a conservação da espécie são necessários, sendo a criopreservação do tecido testicular uma alternativa para recuperação de células germinativas que podem dar continuidade a espermatogênese após aquecimento, em especial, de animais imaturos que venham subitamente a óbito. O objetivo deste trabalho foi comparar os métodos de congelação lenta e vitrificação (com diferentes concentrações de crioprotetores) na conservação da viabilidade e morfologia do tecido testicular de catetos pré-púberes. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFERSA (CEUA/UFERSA). Foram utilizados três machos, com idade entre 6 e 7 meses, mantidos em cativeiro no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS/UFERSA, localizado em Mossoró-RN. Esses animais faziam parte de um abate programado para controle populacional, e após a eutanásia, tiveram suas gônadas imediatamente coletadas e dividida em fragmentos (3 mm³) destinadas a análise imediata (controle fresco) ou à conservação. Um fragmento foi imediatamente destinado a análise de viabilidade por meio das sondas fluorescentes Hoechst 33342 e iodeto de propídio. Outro fragmento seguiu para processamento histológico, com coloração em hematoxilina-eosina, para análise das características morfológicas do tecido, atribuindo-se escores variando de 1 a 3, onde o valor mais alto indicava a integridade tecidual. Na congelação lenta, os fragmentos foram alocados em criotubos contendo 2 mL da solução de congelação (SC), constituída de Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 0,25 M de sacarose, 10% de soro fetal bovino (SFB), e 1,5 M de crioprotetores intracelulares, sendo 0,75 M de dimetilsulfóxido (DMSO) e 0,75 M de etilenoglicol (EG). Cada criotubo foi colocado no dispositivo Mr. Frosty (Fisher Scientific, Brasil) que foi acondicionado em freezer -80°C durante a noite, e armazenados em botijões criobiológicos (-196 °C). Na vitrificação, os fragmentos foram imersos por 5 minutos em solução de MEM, SFB e 0,5 M de sacarose, acrescida de EG + DMSO a 3 M ou 6 M, e colocados sobre superfície sólida metálica em contato com nitrogênio líquido, e posteriormente transferidas para criotubos previamente refrigerados, armazenados em botijões criobiológicos. Após uma semana, as amostras oriundas de ambos os métodos foram aquecidas em banho maria (37 °C) até completo derretimento das soluções, banhadas sucessivamente em soluções de MEM, SFB com concentrações decrescentes de sacarose (0,5 M, 0,25 M e 0 M), e reavaliadas quanto a viabilidade e morfologia. Os dados foram expressos em média e erro padrão, e os tratamentos foram comparados por ANOVA, seguida do teste de Tukey quanto a viabilidade, e pelo teste de Mann-Whitney quanto a morfologia ($P < 0,05$). Uma viabilidade de $87,0 \pm 2,08\%$ foi observada no tecido fresco, verificando-se redução significativa após reaquecimento das amostras em todos os tratamentos. Estes não diferiram entre si ($P > 0,05$), apresentando valores de $52,8 \pm 4,37\%$ para congelação lenta, $63,0 \pm 4,35\%$ para vitrificação a 3 M e $59,5 \pm 5,39\%$ para vitrificação a 6 M de crioprotetores. Na análise morfológica, os métodos de criopreservação apresentaram escores inferiores ao tecido fresco para todas as características observadas, como estrutura dos túbulos seminíferos ($2,80 \pm 0,04$), células perdidas ($2,81 \pm 0,04$), vacuolização celular ($2,68 \pm 0,04$), separação da membrana ($2,97 \pm 0,01$) e ruptura da membrana ($2,74 \pm 0,04$) ($P < 0,05$). Porém, a congelação lenta e a vitrificação com crioprotetores a 6 M apresentaram melhor eficiência que a vitrificação a 3 M ($P < 0,05$), no tocante aos mesmos parâmetros de estrutura dos túbulos seminíferos ($2,07 \pm 0,04$ vs $1,93 \pm 0,04$ vs $1,86 \pm 0,05$), células perdidas ($2,46 \pm 0,07$ vs $2,60 \pm 0,05$ vs $2,33 \pm 0,05$), vacuolização celular ($2,15 \pm 0,06$ vs $2,13 \pm 0,04$ vs $1,92 \pm 0,06$), separação da membrana ($2,65 \pm 0,06$ vs $2,78 \pm 0,04$ vs $2,56 \pm 0,06$), e ruptura da membrana ($2,33 \pm 0,07$ vs $2,30 \pm 0,07$ vs $2,07 \pm 0,06$). Em conclusão, a conservação de tecido testicular de catetos pré-púberes pode ser realizada tanto por congelação lenta como por vitrificação em superfície sólida com DMSO+EG a 6M. No entanto, destaca-se a possibilidade de execução da vitrificação a campo, facilitando sua aplicabilidade em espécies silvestres, como o cateto. Além disso, a técnica de vitrificação demanda menor custo que a congelação lenta, uma vez que não são necessários freezers programáveis.

Palavras-chaves: biobanco, germoplasma, criobiologia, espermatogênese.

Preservation of testicular tissue from prepubertal collared peccary using different cryopreservation methods

Ana Glória Pereira^{1*}, Arthur Emmanuel de Araújo Lago¹, Yuri Gonçalves Matos¹, Jane Cleide Jenuário Martins¹, Andréia Maria da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹; Tainá Moura Matos¹, Andreza Vieira Brasil¹, Yasmim Carla da Silva Cavalcante¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation, (LAGC), UFERSA, Mossoró, RN, Brazil.

*e-mail: anagloriavet@gmail.com

In different biomes, the collared peccary (*Pecari tajacu*) population has suffered a marked decline, being already considered critically endangered in the Atlantic Forest and Caatinga. In view of this, studies for the conservation of the species are necessary, with testicular tissue cryopreservation being an alternative for the recovery of germ cells that can continue spermatogenesis after heating, especially in immature animals that suddenly die. The objective of this work was to compare the methods of slow freezing and vitrification (with different concentrations of cryoprotectants) in the preservation of the viability and morphology of the testicular tissue of prepubertal collared peccaries. The procedures were approved by the Ethics in the Use of Animals Committee of UFERSA (CEUA/UFERSA). Three males, aged between 6 and 7 months, kept in captivity at the Wild Animal Multiplication Center – CEMAS/UFERSA, located in Mossoró-RN, were used. These animals were part of a slaughter scheduled for population control, and after euthanasia, their gonads were immediately collected and divided into fragments (3 mm³) for immediate analysis (fresh control) or conservation. A fragment was immediately destined for viability analysis using fluorescent probes Hoechst 33342 and propidium iodide. Another fragment was sent for histological processing, with hematoxylin-eosin staining, for analysis of the morphological characteristics of the tissue, assigning scores ranging from 1 to 3, where the highest value indicated tissue integrity. In slow freezing, the fragments were placed in cryovials containing 2 mL of freezing solution (SC), consisting of Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 0.25 M sucrose, 10% fetal bovine serum (SFB), and 1.5 M of intracellular cryoprotectants, being 0.75 M of dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.75 M of ethylene glycol (EG). Each cryotube was placed in the Mr. Frosty (Fisher Scientific, Brazil) which was placed in a -80°C freezer overnight, and stored in cryobiological cylinders (-196°C). In vitrification, the fragments were immersed for 5 minutes in a solution of MEM, FBS and 0.5 M sucrose, plus EG+DMSO at 3 M or 6 M concentration and placed on a solid metallic surface in contact with liquid nitrogen, and subsequently transferred to previously refrigerated cryovials, stored in cryobiological cylinders. After a week, the samples from both methods were heated in a water bath (37 °C) until the solutions completely melted, successively bathed in MEM solutions with FBS and decreasing concentrations of sucrose (0.5 M, 0.25 M and 0 M), and reassessed for viability and morphology. Data were expressed as mean and standard error, and treatments were compared by ANOVA, followed by the Tukey test for viability, and the Mann-Whitney test for morphology (P < 0.05). A viability of 87.0 ± 2.08% was observed in the fresh tissue, verifying a significant reduction after reheating the samples in all treatments. These did not differ from each other (P > 0.05), with values of 52.8 ± 4.37% for slow freezing, 63.0 ± 4.35% for vitrification at 3 M and 59.5 ± 5.39% for vitrification at 6 M of cryoprotectants. In the morphological analysis, the cryopreservation methods presented lower scores than the fresh tissue for all the observed characteristics, such as structure of the seminiferous tubules (2.80 ± 0.04), lost cells (2.81 ± 0.04), cellular vacuolation (2.68 ± 0.04), membrane separation (2.97 ± 0.01) and membrane rupture (2.74 ± 0.04) (P < 0.05). However, slow freezing and vitrification with 6 M cryoprotectants showed better efficiency than 3 M vitrification (P < 0.05), regarding the same parameters of structure of the seminiferous tubules (2.07 ± 0.04 vs 1.93 ± 0.04 vs 1.86 ± 0.05), cell loss (2.46 ± 0.07 vs 2.60 ± 0.05 vs 2.33 ± 0.05), cell vacuolation (2.15 ± 0.06 vs 2.13 ± 0.04 vs 1.92 ± 0.06), membrane separation (2.65 ± 0.06 vs 2.78 ± 0.04 vs 2.56 ± 0.06), and membrane rupture (2.33 ± 0.07 vs 2.30 ± 0.07 vs 2.07 ± 0.06). In conclusion, conservation of testicular tissue from prepubertal collared peccaries can be performed either by slow freezing or by vitrification on a solid surface with 6M DMSO+EG. However, the possibility of carrying out vitrification in the field is highlighted, facilitating its applicability in wild species, such as collared peccary. In addition, the vitrification technique is less costly than slow freezing, since programmable freezers are not required.

Keywords: biobank, germplasm, cryobiology, spermatogenesis.

Correlação entre biometria corporal e testicular com a qualidade de espermatozoides epididimários de Cervo Sambar (*Rusa unicolor*)

Amanda Íris dos Santos Correia^{1*}, Rodrigo Freitas Bittencourt¹, Thamys Costa¹, Mateus Martins Rodrigues dos Santos¹, Miguel Ferreira Bomfim Baptista¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana¹, Gleice Mendes Xavier¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Maira Planzo Fernandes¹, Marcos Chalhoub Coelho Lima¹.

¹Sector de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil
*e-mail: aamandairis@hotmail.com

Os cervos Sambar (*Rusa unicolor*) são ruminantes que podem ser encontrados em quase todos os continentes e estão classificados como espécie vulnerável pela União Internacional para a Conservação da Natureza. A eficiência reprodutiva pode ser considerada uma das mais importantes características na preservação dos animais e, por isso, a utilização das biotecnologias da reprodução é fundamental na conservação dessa e de outras espécies com maior vulnerabilidade a extinção. O exame físico é uma ferramenta amplamente utilizada, no qual avalia-se os parâmetros morfométricos corporais e testiculares, correlacionando-os com a fertilidade do indivíduo. Alguns aspectos sexuais, como a circunferência escrotal, são utilizados como ferramenta para prever o potencial reprodutivo do animal, por ser associado à quantidade e qualidade espermática. Assim, objetivou-se estudar a morfometria corpórea de cinco cervos Sambar reprodutores e sua correlação com as características dos espermatozoides epididimários. Na análise de biometria corporal foram mensurados a circunferência de cabeça, o diâmetro torácico, a altura da cernelha e o comprimento total do animal. Além disso, foi realizada a análise da biometria testicular e epididimária, sendo mensurado o comprimento, a largura, a espessura e o peso de cada órgão. Os espermatozoides foram recuperados da cauda do epidídimo utilizando a técnica de *slice* e flutuação, posteriormente analisados subjetivamente quanto os parâmetros: Concentração; Motilidade Progressiva; Motilidade Total; Teste Hiposmótico (HOST); e teste do corante eosina (EOS). A análise computadorizada também foi realizada, utilizando-se o *Computer Assisted Sperm Analyzer* (CASA) obtendo-se os seguintes parâmetros: Velocidade de trajeto (VAP - $\mu\text{m/s}$); Deslocamento lateral de cabeça (ALH - $\mu\text{m/s}$); Velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$); Velocidade progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$); Retilinearidade (STR - %); WOB; Frequência de batimento flagelar (BCF - Hz); e Linearidade (LIN - %). Foi realizado um teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*, seguido da avaliação da associação entre a biometria corporal e testicular com os parâmetros espermáticos, por meio do teste de correlação de Pearson ou de Spearman, com base na distribuição da amostra. As análises foram realizadas com o *software Statistical Package for Social Science* (SPSS, versão 21.0), considerando um nível de significância de 5%. A altura da cernelha apresentou correlação alta e positiva com o VSL ($r=0,96$, $p=0,032$) e concentração espermática ($r=0,94$, $p=0,018$), mas demonstrou influência negativa no HOST ($r=-0,937$, $p=0,019$). A circunferência de cabeça correlacionou-se positivamente com a motilidade progressiva ($r=0,905$, $p=0,035$). Todos os parâmetros da biometria testicular avaliados (largura, comprimento, espessura e peso) apresentaram associação significativa, alta e positiva, com a integridade de membrana dos espermatozoides, avaliada no teste do corante eosina (EOS) ($r=0,945$, $r=0,924$, $r=0,904$, $r=0,896$, respectivamente), além disso, o peso também apresentou influência positiva com a motilidade progressiva ($r=0,915$, $p=0,029$). A largura e a espessura do epidídimo demonstraram influência alta e positiva na concentração espermática ($r=0,947$ e $p=0,014$, $r=0,952$ e $p=0,013$, respectivamente). A espessura epididimária também se correlacionou positivamente com o WOB ($r=0,994$, $p=0,006$), juntamente com o peso do epidídimo ($r=0,998$, $p=0,041$), entretanto, este apresentou relação negativa com o STR ($r=-1,000$, $p=0,001$). Apesar das mensurações corpóreas poderem ser afetadas por diversos fatores, como idade, peso corporal, raça, estação do ano e tipo de nascimento, os resultados obtidos por esse trabalho validam a associação positiva entre aspectos da morfometria dos cervos com a qualidade seminal dessa espécie, além de ser uma ferramenta de fácil aplicação, podendo contribuir para uma seleção mais eficaz dos machos em programas reprodutivos, potencializando o êxito das biotecnologias da reprodução empregadas, o que facilita a sua preservação. Ademais, o estudo possui potencial para adaptar os achados para outras espécies de cervos que também estão ameaçados de extinção.

Palavras-chave: Preservação, Sêmen; Cervídeos, Criopreservação seminal, Parâmetros espermáticos.

Correlation between body and testicular biometrics with epididymal sperm quality of Sambar deer (*Rusa unicolor*).

Amanda Íris dos Santos Correia^{1*}, Rodrigo Freitas Bittencourt¹, Thamys Costa¹, Mateus Martins Rodrigues dos Santos¹, Miguel Ferreira Bomfim Baptista¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana¹, Gleice Mendes Xavier¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Maira Planzo Fernandes¹, Marcos Chalhoub Coelho Lima¹.

¹Sector de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil
*e-mail: aamandairis@hotmail.com

Sambar deer (*Rusa unicolor*) are ruminants that can be found on almost all continents and are classified as a vulnerable species by the International Union for Conservation of Nature. Reproductive efficiency can be considered one of the most important characteristics in the preservation of animals, and therefore the use of reproductive biotechnologies is fundamental in the conservation of this and other species with greater vulnerability to extinction. Physical examination is a widely used tool in which body and testicular morphometric parameters are evaluated, correlating them with individual fertility. Some sexual aspects, such as scrotal circumference, are used as a tool to predict the animal's reproductive potential, as it is associated with sperm quantity and quality. Thus, the objective of this study was to study the body morphometry of five Sambar deer and its correlation with epididymal sperm characteristics. Head circumference, thoracic diameter, withers height, and total body length of the animal were measured in the analysis of body biometry. In addition, testicular and epididymal biometry analysis was performed, measuring the length, width, thickness, and weight of each organ. Sperm were recovered from the tail of the epididymis using the slice and float technique and were subsequently subjectively analyzed for parameters such as concentration, progressive motility, total motility, hypoosmotic swelling test (HOST), and eosin dye test (EOS). Computerized analysis was also performed using the Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA), obtaining the following parameters: path velocity (VAP - $\mu\text{m/s}$); lateral head displacement (ALH - $\mu\text{m/s}$); curvilinear velocity (VCL - $\mu\text{m/s}$); progressive velocity (VSL - $\mu\text{m/s}$); straightness (STR - %); WOB; flagellar beat frequency (BCF - Hz); and linearity (LIN - %). A Shapiro-Wilk normality test was performed, followed by evaluation of the association between body and testicular biometry with sperm parameters, using the Pearson or Spearman correlation test based on the sample distribution. The analyses were performed using the Statistical Package for Social Science (SPSS, version 21.0), considering a significance level of 5%. The withers height showed a significant, high and positive correlation with VSL ($r=0.96$, $p=0.032$) and sperm concentration ($r=0.94$, $p=0.018$), but demonstrated a negative influence on HOST ($r=-0.937$, $p=0.019$). Head circumference correlated positively with progressive motility ($r=0.905$, $p=0.035$). All evaluated testicular biometry parameters (width, length, thickness, and weight) presented a high and positive association with sperm membrane integrity, evaluated in the eosin dye test (EOS) ($r=0.945$, $r=0.924$, $r=0.904$, $r=0.896$, respectively), in addition, weight also showed a positive influence on progressive motility ($r=0.915$, $p=0.029$). The width and thickness of the epididymis showed a high and positive influence on sperm concentration ($r=0.947$ and $p=0.014$, $r=0.952$ and $p=0.013$, respectively). Epididymal thickness also correlated positively with WOB ($r=0.994$, $p=0.006$), along with epididymal weight ($r=0.998$, $p=0.041$), however, it presented a negative relationship with STR ($r=-1.000$, $p=0.001$). Despite the fact that body measurements can be influenced by several factors such as age, body weight, breed, season, and birth type, the results obtained in this study validate the positive association between aspects of deer morphometry and semen quality of this species. Moreover, these findings can serve as a practical tool that can contribute to a more efficient selection of males in reproductive programs, enhancing the success of the applied reproductive biotechnologies, which in turn facilitates the conservation of the species. Additionally, this study holds potential for adapting its findings to other endangered deer species.

Keywords: Preservation, Semen; Cervids, Seminal Cryopreservation, Sperm Parameters.

Influência do tipo de lâmina utilizada na avaliação computadorizada sobre os parâmetros cinéticos espermáticos de cervos Sambar (*Rusa unicorn*)

Miguel Ferreira Bomfim Baptista^{1*}, Gleice Mendes Xavier¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Maíra Planzo Fernandes¹, Mateus Martins Rodrigues dos Santos¹, Amanda Íris dos Santos Correia¹, Thamys Costa¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

*e-mail: miguelffb@gmail.com

O sistema computadorizado de análise espermática (CASA) é utilizado para fornecer informações precisas sobre a cinética, morfologia e concentração espermática. No entanto, para alcançar resultados confiáveis e uma avaliação mais objetiva sobre esses parâmetros, esse sistema necessita uniformizar as variáveis que podem causar interferências. Dentre essas variáveis, a lâmina utilizada para análise seminal possui um papel de importância, podendo afetar diretamente na precisão e na variabilidade dos resultados. No mercado existem diversos tipos de lâminas que podem ser utilizadas no CASA, variando em volume, profundidade, forma e preenchimento das suas câmaras, dependendo do fabricante. Visto isso, esse trabalho objetiva analisar e comparar os parâmetros de cinética espermática utilizando dois tipos de lâminas para análise seminal: lâmina sob lamínula e lâmina Leja[®]. Para tanto, foram utilizadas oito amostras de sêmen de cervos Sambar (*Rusa unicorn*) pertencentes ao Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, Salvador, Bahia. As amostras de sêmen foram diluídas em meio próprio para diluição feito a base de TRIS-GEMA, no volume de 10 microlitros em cada lâmina, e foram divididas de forma aleatória e homogênea em dois grupos experimentais: grupo Leja (n=8), com deposição em Leja[®] 20µm e grupo lâmina/lamínula (n=8), com deposição em lâmina sob lamínula 24x24mm. Para as análises computadorizadas da cinética, utilizou o sistema SCA[®] (New Rout, Miami, USA), no Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária do HOSPMEV-UFBA. Em cada grupo foram analisados os seguintes parâmetros espermáticos: Motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s), velocidade de percurso (VAP, µm/s), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), espermatozoides imóveis (IMOV, %), espermatozoides rápidos (RAP, %), espermatozoides médios (MED, %) e espermatozoides lentos (LEN, %). Os dados foram processados estatisticamente pelo programa Statistical Package for Social Science (SPSS) versão 21.0 para windows sendo realizado uma análise sobre a média e desvio padrão das variáveis de interesse ao estudo obtidas por meio da análise descritiva. Para todas as análises foram consideradas diferenças significativas quando $P \leq 0,05$. Os resultados obtidos pelo sistema SCA[®] entre o grupo lâmina/lamínula e o grupo Leja são, respectivamente, MT: 61,34±18,32 e 49,87±8,70%; MP: 46,15±18,94 e 34,11±7,89%; RAP: 42,46±20,10 e 30,66±6,81%; MED: 8,31±0,75 e 8,82±1,26%; LEN: 10,56±7,71 e 10,41±1,40%; IMOV: 38,65±18,32 e 50,1±8,68%; VCL: 112,39±20,62 e 103,56±4,01 µm/s; VAP: 66,36±16,22 e 55,69±5,01 µm/seg; VSL: 34,08±11,34 e 28,11±4,29 µm/seg; STR: 53,54±11,38 e 52,44±4,19%; LIN: 34,08±10,77 e 29,74±2,65%; WOB: 60±6,73 e 54±2,61%; ALH: 4,33±0,8 e 4,28±,15 µm; BCF: 9,17±1,47 e 8,9±0,81 Hz. Apesar do presente estudo não ter observado diferença significativa entre as lâminas utilizadas, a diferença superior a 10% nos valores numéricos para MT e MP, pode indicar que a técnica de lâmina e lamínula, por não possibilitar amostras homogêneas em toda a extensão da área analisada, pode superestimar as análises, caso elas sejam focadas no centro do campo. Entretanto, os estudos devem continuar para esta e outras espécies, especialmente pelo fator econômico envolvido, desde que não represente comprometimento das análises e parâmetros estudados. Em estudos futuros sugere-se a utilização de n amostral maior para aumentar a representatividade e acurácia do estudo.

Palavras-chave: Criopreservação, Espermograma, Sêmen.

Influence of the type of blade used in computerized evaluation on the sperm kinetic parameters of Sambar deer (*Rusa unicolor*)

Miguel Ferreira Bomfim Baptista^{1*}, Gleice Mendes Xavier¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Eduardo de Oliveira Costa¹, Maíra Planzo Fernandes¹, Mateus Martins Rodrigues dos Santos¹, Amanda Íris dos Santos Correia¹, Thamys Costa¹, Elisa Lacerda d'Afonseca Santana¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Department of Animal Reproduction and Veterinary Obstetrics, Department of Anatomy, Pathology, and Clinics, School of Veterinary Medicine and Zootechnics, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

*e-mail: miguelffb@gmail.com

The computerized semen analysis system (CASA) is used to provide accurate information about sperm kinetics, morphology, and concentration. However, to achieve reliable results and a more objective evaluation of these parameters, this system needs to standardize variables that can cause interference. Among these variables, the slide used for seminal analysis plays an important role, as it can directly affect the accuracy and variability of the results. There are various types of slides available on the market for use with CASA, varying in volume, depth, shape, and chamber filling, depending on the manufacturer. Therefore, this study aims to analyze and compare sperm kinetic parameters using two types of slides for seminal analysis: coverslip slides and Leja® slides. For this purpose, eight semen samples from Sambar deer (*Rusa unicolor*) belonging to the Getúlio Vargas Zoobotanical Park, Salvador, Bahia, were used. The semen samples were diluted in a specific dilution medium based on TRIS-GEMA, with a volume of 10 microliters on each slide, and were randomly and evenly divided into two experimental groups: Leja group (n=8), with deposition on Leja® 20µm slides, and slide/coverslip group (n=8), with deposition on coverslip slides (24x24mm). For the computerized kinetic analysis, the SCA® system (New Rout, Miami, USA) was used at the Animal Reproduction and Veterinary Obstetrics sector of HOSPMEV-UFBA. The following sperm parameters were analyzed in each group: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight-line velocity (VSL, µm/s), average path velocity (VAP, µm/s), linearity (LIN, %), straightness (STR, %), wobble coefficient (WOB, %), lateral head displacement (ALH, µm), beat cross frequency (BCF, Hz), immotile spermatozoa (IMOT, %), fast spermatozoa (RAP, %), medium-speed spermatozoa (MSP, %), and slow spermatozoa (SSP, %). The data were statistically processed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 21.0 for Windows, performing an analysis of the mean and standard deviation of the variables of interest in the study obtained through descriptive analysis. For all analyses, statistically significant differences were considered when $P \leq 0.05$. The results obtained by the SCA® system between the slide/coverslip group and the Leja group are, respectively: TM: 61.34±18.32 and 49.87±8.70%; PM: 46.15±18.94 and 34.11±7.89%; RAP: 42.46±20.10 and 30.66±6.81%; MSP: 8.31±0.75 and 8.82±1.26%; SSP: 10.56±7.71 and 10.41±1.40%; IMOT: 38.65±18.32 and 50.1±8.68%; VCL: 112.39±20.62 and 103.56±4.01 µm/s; VAP: 66.36±16.22 and 55.69±5.01 µm/sec; VSL: 34.08±11.34 and 28.11±4.29 µm/sec; STR: 53.54±11.38 and 52.44±4.19%; LIN: 34.08±10.77 and 29.74±2.65%; WOB: 60±6.73 and 54±2.61%; ALH: 4.33±0.8 and 4.28±0.15 µm; BCF: 9.17±1.47 and 8.9±0.81 Hz. Although this study did not observe a significant difference between the slides used, the difference of more than 10% in the numerical values for TM and PM may indicate that the slide and coverslip technique, by not allowing homogeneous samples throughout the analyzed area, may overestimate the analyses if they are focused on the center of the field. However, further studies should be conducted for this and other species, especially considering the economic factor involved, as long as they do not compromise the analyzed parameters. In future studies, it is suggested to use a larger sample size to increase the representativeness and accuracy of the study.

Keywords: Cryopreservation, Spermogram, Semen.

Integridade da membrana plasmática de espermatozoides de emas (*Rhea americana*) avaliada por corantes vitais e marcadores fluorescentes

Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Andréia Maria Silva¹, Romário Parente dos Santos¹, Samara Sandy Jerônimo Moreira¹, Maiko Roberto Tavares Dantas¹, Ana Glória Pereira¹, Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratório de Germoplasma Animal (LCGA), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil
*e-mail: alexrs@ufersa.edu.br

As emas (*Rhea americana*) são aves ratitas da América do Sul que possuem grande importância ecológica na manutenção da biodiversidade brasileira, por atuarem na dispersão de sementes e na manutenção de seus predadores. Mas apesar de sua notoriedade, as emas são classificadas globalmente como quase ameaçadas segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), sendo iminente a necessidade de implementação de medidas de conservação. Para tanto, a criopreservação de espermatozoides aparece como alternativa interessante, sendo, porém, ainda necessário um melhor conhecimento a respeito das características espermáticas da espécie. Neste sentido, objetivou-se estabelecer métodos para avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática de espermatozoides de emas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFERSA (Processo nº. 23091.001423/2020-8), que autorizou o abate de sete animais adultos oriundos do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS – UFERSA) para fins de diferentes estudos científicos. Os animais foram então pré-medicados com cloridrato de xilazina (Xilazin[®] 2%, Syntec, São Paulo, Brasil) e cloridrato de cetamina 15mg/kg (Quetamina[®], Vetnil, Louveira, Brasil) em combinação por via intramuscular, seguida de indução anestésica com Tiopental (Thiopentax[®], Cristalia, São Paulo, Brasil), e eutanasiados por administração intracardíaca de Cloreto de Potássio (Potassium Chloride[®] 19.1%, Equiplex, Goiania, Brasil). Os espermatozoides foram obtidos utilizando-se a técnica de flutuação por fatiamento dos ductos deferentes em placa de Petri contendo solução salina a 38°C e, após 5 minutos, os tecidos foram retirados e a solução com espermatozoides foi recuperada. Para as avaliações da membrana espermática, foram confeccionados dois esfregaços com corantes vitais, sendo um com azul de bromofenol, e o outro com eosina-nigrosina, ambos na proporção de 10 µl de sêmen para a mesma quantidade de corante. Em cada esfregaço, cem células foram contadas sob microscopia óptica (400x). Para os espermatozoides corados com azul de bromofenol, as células transparentes foram consideradas como tendo uma membrana plasmática intacta e as células coradas em azul foram consideradas como tendo uma membrana plasmática danificada. Já para os espermatozoides corados com eosina-nigrosina, foram considerados com membrana danificada aqueles que apresentaram coloração rosada. Foi também procedida a análise com a associação de sondas fluorescentes, incubando-se 10 µl de sêmen a 37°C por 10 min com 2 µl Hoechst 33342 (H342, Molecular Probes, Eugene, Estados Unidos), seguidos da adição de 3 µl de Iodeto de Propídio (IP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Estados Unidos) e incubação por mais 8 min. As amostras foram observadas sob microscópio de epifluorescência, contando-se 100 células por amostra. Os espermatozoides marcados em azul (H342) foram classificados com membrana plasmática intacta, e os observados em vermelho (PI) foram classificados como danificados. Os dados foram expressos em média e erro padrão e testados quanto a normalidade e a homocedasticidade. As associações entre a integridade da membrana avaliada por corantes vitais e sondas fluorescentes foram investigadas usando-se o teste de correlação de Pearson ($P < 0,05$). Nas amostras avaliadas com os corantes vitais, foi possível observar células danificadas com colorações mais fortes e algumas com colorações mais fracas, o que, associado ao formato filiforme das células gerou um pouco de dúvida no momento das avaliações. Contudo foi possível observar $64,6 \pm 5,2\%$ dos espermatozoides com membrana íntegra quando se utilizou azul de bromofenol e $72,1 \pm 2,5\%$ com eosina-nigrosina. A avaliação utilizando-se a associação de sonda fluorescente se mostrou mais prática do que a realizada com os corantes, haja vista a melhor distinção dos padrões de marcação, sendo observados $65,3 \pm 2,6\%$ de espermatozoides íntegros. Embora os valores sejam próximos numericamente, não foi observada correlação entre os resultados dos três métodos de avaliação ($P > 0,05$). É válido ressaltar que a metodologia utilizando os corantes é mais barata e aplicável à campo. Em conclusão, indicamos quando possível avaliar a membrana plasmática de espermatozoides de emas com associação de sondas fluorescentes Hoechst 33342+ IP, contudo, à campo os corantes vitais azul de bromofenol e eosina-nigrosina também poderiam ser utilizados.

Palavras-Chaves: Vida Selvagem, Ratitas, Membrana Plasmática, Biobanco.

Plasma membrane integrity of rhea (*Rhea americana*) spermatozoa evaluated vital dyes and fluorescent probes

Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Andréia Maria Silva¹, Romário Parente dos Santos¹, Samara Sandy Jerônimo Moreira¹, Maiko Roberto Tavares Dantas¹, Ana Glória Pereira¹, Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratório de Germoplasma Animal (LCGA), UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

*e-mail: alexrs@ufersa.edu.br

The rheas (*Rhea americana*) are South American ratite birds that have great ecological importance in the maintenance of Brazilian biodiversity, as they act in the dispersion of seeds and in the maintenance of their predators. But despite their notoriety, rheas are classified globally as near threatened according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN), with an imminent need to implement conservation measures. Therefore, sperm cryopreservation appears as an interesting alternative, but a better understanding of the sperm characteristics of the species is still necessary. In this sense, the objective was to establish methods to evaluate the structural integrity of the plasma membrane of rhea spermatozoa. The experimental procedures were approved by the UFERSA Ethics Committee (Process No. 23091.001423/2020-8), which authorized the slaughter of seven adult animals from the Wild Animal Multiplication Center (CEMAS – UFERSA) for the purposes of different scientific studies. The animals were then premedicated with xylazine hydrochloride (Xilazin® 2%, Syntec, São Paulo, Brazil) and ketamine hydrochloride 15mg/kg (Quetamina®, Vetnil, Louveira, Brazil) in combination intramuscularly, followed by induction anesthetic with Thiopental (Thiopentax®, Cristalia, São Paulo, Brazil), and euthanized by intracardiac administration of Potassium Chloride (Potassium Chloride® 19.1%, Equiplex, Goiania, Brazil). The spermatozoa were obtained using the flotation technique by slicing the vas deferens in a Petri dish containing saline solution at 38°C and, after 5 minutes, the tissues were removed and the solution with spermatozoa was recovered. For evaluations of the spermatid membrane, two smears were made with vital dyes, one with bromophenol blue, and the other with eosin-nigrosin, both in the proportion of 10 µl of semen for the same amount of dye. In each smear, one hundred cells were counted under optical microscopy (400x). For spermatozoa stained with bromophenol blue, clear cells were considered to have an intact plasma membrane and cells stained blue were considered to have a damaged plasma membrane. As for the spermatozoa stained with eosin-nigrosin, those that presented a pink color were considered to have a damaged membrane. The analysis was also carried out with the association of fluorescent probes, incubating 10 µl of semen at 37°C for 10 min with 2 µl Hoechst 33342 (H342, Molecular Probes, Eugene, United States), followed by the addition of 3 µl of iodide of Propidium (IP, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and incubation for another 8 min. The samples were observed under an epifluorescence microscope, counting 100 cells per sample. The spermatozoa marked in blue (H342) were classified as having an intact plasma membrane, and those observed in red (PI) were classified as damaged. Data were expressed as mean and standard error and tested for normality and homoscedasticity. Associations between membrane integrity assessed by vital stains and fluorescent probes were investigated using Pearson's correlation test ($P < 0.05$). In the samples evaluated with the vital dyes, it was possible to observe damaged cells with stronger stains and some with weaker stains, which, associated with the threadlike shape of the cells, generated a little doubt at the time of the assessments. However, it was possible to observe $64.6 \pm 5.2\%$ of spermatozoa with intact membrane when using bromophenol blue and $72.1 \pm 2.5\%$ with eosin-nigrosin. The evaluation using the fluorescent probe association proved to be more practical than that performed with the dyes, given the better distinction of the marking patterns, with $65.3 \pm 2.6\%$ of intact spermatozoa being observed. Although the values are numerically close, no correlation was observed between the results of the three evaluation methods ($P > 0.05$). It is worth noting that the methodology using dyes is cheaper and applicable to the field. In conclusion, we indicate, when possible, to evaluate the plasma membrane of rhea spermatozoa with the association of fluorescent probes Hoechst 33342+ IP, however, in the field, the vital dyes bromophenol blue and eosin-nigrosin could also be used.

Keywords: Wildlife, Ratites, Plasma Membrane, Biobank.

Relação dos constituintes bioquímicos do plasma seminal de cutias com as características ambientais dos diferentes períodos climáticos do bioma Caatinga

Yasmim Carla da Silva Cavalcante^{1*}; Ana Glória Pereira¹; Maiko Roberto Tavares Dantas¹, Samara Sandy Jerônimo Moreira¹; Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró - RN, Brasil

*e-mail: yacs.cavalcante@gmail.com

A cutia (*Dasyprocta leporina*), roedor histicognato silvestre, apresenta grande importância para o equilíbrio ambiental da Caatinga, onde atua como dispersor de sementes, contribui para a aerificação do solo, e é importante elo na cadeia alimentar de carnívoros. Esse bioma é caracterizado por um curto período chuvoso, seguido por um longo período seco de aproximadamente nove meses. Em algumas espécies, sabe-se que essa variação climática atua como fator determinante de sua reprodução. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é descrever os constituintes bioquímicos orgânicos e inorgânicos presentes no plasma seminal de cutias em sistema de conservação *ex situ*, avaliados sob os diferentes períodos climáticos do bioma Caatinga. A partir de uma estação climática automática localizada próxima ao local de estudo, o Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) da UFERSA, em Mossoró – RN, foram analisadas as variáveis ambientais referentes ao volume total de chuva (mm³), temperatura do ar (°C), velocidade do vento (m/s), radiação global (W/m²) e umidade (g/m³) em cada período. No CEMAS, utilizaram-se seis animais adultos, que foram mantidos em cativeiro, com alimentação similar em ambos os períodos climáticos, constituída por ração comercial para coelhos (1x ao dia) suplementada com frutas e milho, e oferta de água *ad libitum*. Cada machos de cutia foi submetido a três coletas de amostras do plasma seminal por eletroejaculação em ambos os períodos climáticos. Os ejaculados foram coletados em Eppendorfs, feita a mensuração do volume e a avaliação ao microscópio de luz para confirmar ausência de espermatozoides. Ressalta-se que a ocorrência de ejaculados azoospérmicos é extremamente comum na espécie, possibilitando um estudo exclusivo do plasma seminal sem interferência de constituintes bioquímicos derivados do espermatozoide. As amostras foram centrifugadas em 700G para separar os resíduos sólidos e o sobrenadante foi refrigerado a -20 °C, até a ocasião da análise bioquímica por meio de kits comerciais e espectrofotometria quanto à presença e concentração de componentes bioquímicos orgânicos (proteínas totais, albumina, colesterol, triglicérides, frutose e glicose) e inorgânicos (fósforo, magnésio, cálcio, ferro, cloretos, sódio e potássio). Os dados foram expressos como média e erro padrão. Para avaliar as alterações sazonais e do ambiente térmico sobre os parâmetros bioquímicos do plasma seminal, uma ANOVA unilateral foi realizada usando o PROC GLM do SAS ($P < 0,05$). O teste de correlação de Spearman foi aplicado usando o PROC CORR do SAS para determinar as associações entre as variáveis estudadas ($P < 0,05$). As médias de temperatura do ar (°C), umidade relativa do ar (%), velocidade do vento (m/s) e precipitação total (mm) para as estações seca e chuvosa foram, respectivamente: 27,3 e 27,5 °C, 66,8 e 80,1%, 4,0 e 1,9 m/s, 0,2 e 517,7 mm. Um total de 18 amostras foi obtido em cada período, e o volume médio de plasma seminal obtido no período seco ($575,00 \pm 162,52 \mu\text{L}$) foi maior que o coletado no período chuvoso ($0,484 \pm 88,56 \text{ ml } \mu\text{L}$). No tocante aos componentes bioquímicos do plasma seminal, foram identificadas concentrações maiores de glicose (88.24 mg/dl e 26.27 mg/dl), fósforo (66.40 mg/dl e 3.67 mg/dl) e potássio (92.67 mmol/L e 19.68 mmol/L) no período seco em comparação com o chuvoso ($P < 0,05$). Os valores de frutose não diferiram estatisticamente em relação aos dois períodos analisados, mas as concentrações de cloretos (43.04 mEq/L e 201.40 mEq/L) foram maiores no período chuvoso ($P < 0,05$). Quanto às correlações significativas ($P < 0,05$), as concentrações de glicose correlacionaram-se negativamente com o volume de chuva total ($r = -0,69$) e com o nível de umidade ($r = -0,67$), e positivamente com a radiação global ($r = 0,78$), temperatura do ar ($r = 0,74$) e velocidade do vento ($r = 0,72$). No que diz respeito aos cloretos, houve correlações positivas entre as concentrações obtidas com o volume de chuva total ($r = 0,83$) e a umidade ($r = 0,678$), mas correlacionaram-se negativamente com a radiação global ($r = -0,64$), temperatura do ar ($r = -0,54$) e velocidade do vento ($r = -0,71$). Houve correlações positivas entre as concentrações de fósforo e a radiação global ($r = 0,81$), temperatura do ar ($r = 0,80$) e velocidade do vento ($r = 0,77$), mas correlações negativas deste componente com o volume de chuva total ($r = -0,82$) e o nível de umidade ($r = -0,72$). Em relação ao potássio, houve correlação negativa entre suas concentrações e o volume de chuva total ($r = -0,79$). Em conclusão, verifica-se que existem correlações importantes entre os constituintes bioquímicos do plasma seminal de cutias com as variáveis ambientais dos diferentes períodos climáticos do bioma Caatinga. Estas informações serão úteis para uma melhor compreensão da fisiologia reprodutiva da espécie, bem como para o aperfeiçoamento de protocolos de conservação espermática voltados para a formação de biobancos.

Palavras-chave: Bioquímica seminal, Influência ambiental, Plasma seminal, Rodentia.

Relationship of the biochemical constituents of the seminal plasma of agouti with the environmental characteristics of the different climatic periods of the Caatinga biome

Yasmim Carla da Silva Cavalcante^{1*}, Ana Glória Pereira¹, Maiko Roberto Tavares Dantas¹, Samara Sandy Jerônimo Moreira¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Animal Germplasm Conservation Laboratory, Federal Rural University of the Semi-Arid – UFERSA, Mossoró - RN, Brazil
*e-mail: yacs.cavalcante@gmail.com

The agouti (*Dasyprocta leoporina*), a wild hystricognath rodent, is of great importance for the environmental balance of the Caatinga, where it acts as a seed disperser, contributes to soil aeration, and is an important link in the food chain for carnivores. This biome is characterized by a short rainy period, followed by a long dry period of approximately nine months. In some species, it is known that this climatic variation acts as a determining factor in their reproduction. In this context, the objective of this work is to describe the organic and inorganic biochemical constituents present in the seminal plasma of agoutis in an *ex situ* conservation system, evaluated under the different climatic periods of the Caatinga biome. From an automatic climate station located close to the study site, the Center for the Multiplication of Wild Animals (CEMAS) of UFERSA, in Mossoró - RN, the environmental variables were analyzed referring to the total volume of rain (mm³), air temperature (°C), wind speed (m/s), global radiation (W/m²) and humidity (g/m³) in each period. In CEMAS, six adult animals were used, which were kept in captivity, with similar food in both climatic periods, consisting of commercial rabbit ration (1x a day) supplemented with fruits and corn, and water offered *ad libitum*. Each agouti male was submitted to three collections of seminal plasma samples by electroejaculation in both climatic periods. The ejaculates were collected in Eppendorfs, the volume was measured, and sample was evaluated under a light microscope to confirm the absence of spermatozoa. It is noteworthy that the occurrence of azoospermic ejaculates is extremely common in the species, allowing an exclusive study of seminal plasma without interference from biochemical constituents derived from sperm. The samples were centrifuged at 700G to separate solid residues and the supernatant was refrigerated at -20 °C, until the occasion of the biochemical analysis using commercial kits and spectrophotometry regarding the presence and concentration of organic biochemical components (total proteins, albumin, cholesterol, triglycerides, fructose, and glucose) and inorganic (phosphorus, magnesium, calcium, iron, chlorides, sodium, and potassium). Data were expressed as mean and standard error. To assess seasonal and thermal environment changes on seminal plasma biochemical parameters, a one-way ANOVA was performed using the SAS PROC GLM ($P < 0.05$). Spearman's correlation test was applied using the SAS PROC CORR to determine the associations between the studied variables ($P < 0.05$). The average air temperature (°C), relative humidity (%), wind speed (m/s) and total precipitation (mm) for the dry and rainy seasons were, respectively: 27.3 and 27.5 °C, 66.8 and 80.1%, 4.0 and 1.9 m/s, 0.2 and 517.7 mm. A total of 18 samples was obtained in each period, and the average volume of seminal plasma obtained in the dry season ($575.00 \pm 162.52 \mu\text{L}$) was greater than that collected in the rainy season ($0.484 \pm 88.56 \text{ ml } \mu\text{L}$). Regarding the biochemical components of seminal plasma, higher concentrations of glucose (88.24 mg/dl and 26.27 mg/dL), phosphorus (66.40 mg/dL and 3.67 mg/dL) and potassium (92.67 mmol/L and 19.68 mmol/L) were identified in the dry season compared to the rainy season ($P < 0.05$). The fructose values did not differ statistically in relation to the two analyzed periods, but the chloride concentrations (43.04 mEq/L and 201.40 mEq/L) were higher in the rainy season ($P < 0.05$). As for significant correlations ($P < 0.05$), glucose concentrations correlated negatively with total rainfall volume ($r = -0.69$) and with humidity level ($r = -0.67$), and positively with global radiation ($r = 0.78$), air temperature ($r = 0.74$) and wind speed ($r = 0.72$). With regard to chlorides, there were positive correlations between the concentrations obtained with total rainfall ($r = 0.83$) and humidity ($r = 0.678$), but negatively correlated with global radiation ($r = -0.64$), air temperature ($r = -0.54$) and wind speed ($r = -0.71$). There were positive correlations between phosphorus concentrations and global radiation ($r = 0.81$), air temperature ($r = 0.80$) and wind speed ($r = 0.77$), but negative correlations of this component with total rainfall volume ($r = -0.82$) and the moisture level ($r = -0.72$). Regarding potassium, there was a negative correlation between its concentrations and total rainfall volume ($r = -0.79$). In conclusion, it appears that there are important correlations between the biochemical constituents of the seminal plasma of agoutis with the environmental variables of the different climatic periods of the Caatinga biome. This information will be useful for a better understanding of the reproductive physiology of the species, as well as for the improvement of sperm conservation protocols aimed at the formation of biobanks.

Keywords: Environmental influence, Seminal biochemistry, Seminal plasma, Rodentia.

Separação de espermatozoides de alta qualidade por um método nanotecnológico de ativação magnética em animais selvagens e domésticos

Teresinha Inês de Assumpção

Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG
*e-mail:teassumpcao@ufu.br

A fertilidade do macho requer muita atenção pois os espermatozoides têm que ser capazes de fertilizar o oócito e garantir o desenvolvimento do embrião. A qualidade dos ejaculados é muito variável tanto nas espécies domésticas quanto nas selvagens, pois este é composto por várias subpopulações espermáticas que trazem uma variedade de modificações estruturais e funcionais, sendo que algumas destas anormalidades traduzem apoptose celular e estão correlacionadas diretamente com as falhas de fertilidade *in vivo* e *in vitro*. O objetivo do estudo foi realizar a seleção de espermatozoides de alta qualidade através da separação espermática por ativação magnética (SEAM) em sêmen fresco de bovinos, cervídeos, equinos e felinos domésticos, avaliando a qualidade das células após o processo de seleção espermática. Foi coletado sêmen de animais que apresentaram alta quantidade de anormalidades espermáticas (> 30%), sendo: 1) vinte e um touros da raça Nelore pela técnica de vagina artificial; 2) seis cervídeos do gênero *Mazama* pela técnica de eletroejaculação, após contenção química; 3) dez equinos das raças Mangalarga e Quarto de Milha pela técnica de vagina artificial e 4) dez gatos domésticos sem raça definida pela técnica de coleta farmacológica (dexmedetomidina) e cateterização uretral. As amostras analisadas foram: 1) sêmen fresco; 2) pós separação por centrifugação em gradiente de densidade (DGC); 3) pós separação por SEAM (porção não apoptótica - NAP); 4) pós separação por SEAM (porção apoptótica - APT) e 5) pós separação por SEAM seguida da DGC (NAP-DGC). Foram realizadas as análises de motilidade (método CASA ou microscopia óptica), concentração (câmara de Neubauer), morfologia do sêmen (câmara úmida em contraste de fase). Utilizou-se sondas fluorescentes na avaliação da integridade da membrana celular (FITC/IP) e potencial mitocondrial (JC-1) em citometria de fluxo nos bovinos, nas outras espécies foi feito esfregão de sêmen corado com eosina/ nigrosina. Na separação espermática por DGC utilizou-se 20 milhões de espermatozoides em gradiente de duas camadas de 400 µl cada de Percoll a 90% e 45%, que após centrifugação a 900 G por 5 minutos, o *pellet* foi diluído em HEPES. A separação dos espermatozoides por SEAM utilizou 10 milhões de espermatozoides diluídos em 1,5 ml de HEPES, seguido de centrifugação a 300 G por 10 min. O pellet foi ressuscitado em 150 µl de HEPES e adicionado 20 µl de nanopartículas ligadas à anexina V, que após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, procedeu-se a filtração na coluna de separação magnética MiniMACS® ou SEAM (protótipo em pedido de patente). A fração NAP foi coletada em tubo de 2 mL e a fração APT ligada às microesferas foi coletada removendo a coluna do ímã e adicionando 300 µl do HEPES. A separação espermática por SEAM seguida por DGC foi uma junção das duas metodologias. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo procedimento UNIVARIATE e submetidos ao teste de Bartlett (bovinos) e teste de Shapiro-Wilk (cervos, equinos e gatos) para verificar a homogeneidade das variâncias. As comparações entre tratamentos foram feitas pelo procedimento MIXED do SAS e as diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey, com significância de $p \leq 0,05$. As técnicas de SEAM e DGC foram eficientes na redução de anormalidades espermáticas, retirando principalmente defeitos de cabeça e cauda. Em bovinos a combinação dos dois métodos de processamento de espermatozoides (DGC e SEAM) foi significativamente mais efetiva na produção de amostras de espermatozoides de alta qualidade que os mesmos separadamente (redução de mais de 70% nas anormalidades). A morfologia espermática nos bovinos foi semelhante entre as amostras fresco ($35,04 \pm 2,29^a$) e APT ($30,68 \pm 1,94^a$), entre a DGC ($21,50 \pm 1,47^b$) e NAP ($17,30 \pm 1,10^b$) e diferente para NAP-DGC ($10,50 \pm 1,46^c$), as análises de integridade de membrana e no potencial mitocondrial foram semelhantes entre as amostras com exceção da APT, que teve queda de 50% e 20%, respectivamente. Resultados semelhantes na morfologia foi obtida nos cervos: semelhante entre fresco ($41,83 \pm 10,25^a$) e APT ($33,83 \pm 8,49^a$), entre a DGC ($14,83 \pm 3,17^b$) e NAP ($12 \pm 3,01^b$) e queda apenas na integridade de membrana na APT (67%). O mesmo em equinos: semelhante entre fresco ($43,20 \pm 2,78^a$) e APT ($44,5 \pm 2,96^a$) e entre a DGC ($15,6 \pm 2,10^b$) e NAP ($24,30 \pm 1,63^b$), integridade de membrana foi semelhante nas amostras DGC e NAP, com aumento de 30% em relação ao fresco e uma redução mais de 50% na APT. Já nos gatos o resultado foi variado com semelhança entre o fresco ($47,9 \pm 4,47^a$) e APT ($43,0 \pm 5,16^{ab}$) e desta com a NAP ($29,8 \pm 4,90^{ab}$) e diferente da DGC ($15,4 \pm 0,95^c$), com diferença na integridade de membrana apenas na APT (queda de 13%). Nestas três espécies, a motilidade das amostras pós SEAM foi baixa talvez devido a maior sensibilidade da célula espermática nestas espécies, ao número de procedimentos a que a célula foi submetida e o tempo grande dispendido nas análises. Estes achados sugerem que este método nanotecnológico é eficiente na produção de amostras de sêmen de alta qualidade para procedimentos de reprodução assistida tanto em animais domésticos quanto selvagem, mas ainda são necessários mais estudos para melhor entendimento das características particulares das células espermáticas de cada espécie, a fim de melhorar os resultados da técnica.

Palavras-chave: Reprodução animal, andrologia, fertilidade, sêmen, animais domésticos, cervídeos.

Íntegra da pesquisa em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36304>.

Separation of high-quality spermatozoa by a nanotechnological method of magnetic activation in wild and domestic animals

Teresinha Inês de Assumpção

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

*e-mail: teassumpcao@ufu.br

Reproduction is a fascinating process that occurs in mammals, and it is essential for the survival of any species. Male fertility requires a lot of attention because sperm must be able to fertilize oocyte and ensure the embryo's development. The ejaculates' quality is highly variable in both domestic and wild species, since it is composed of several spermatid subpopulations, bringing a variety of structural and functional modifications, and some of those abnormalities translate cellular apoptosis and are directly correlated with fertility failures *in vivo* and *in vitro*. This study aimed at improving selection of high-quality sperm through sperm separation by magnetic activation in fresh semen of cattle, deer, horses, and domestic cats by evaluating the cells' quality after the sperm selection process. For this, semen was collected from animals with a high number of spermatid abnormalities (> 30%), being: 1) Nellore bulls (n=21), using the artificial vagina restraint; 2) six *Mazama* deer, using the electroejaculation technique and after chemical containment; 3) ten horses Mangalarga and American Quarter horse, using the artificial vagina technique, and 4) ten domestic cats without defined breed, using pharmacological ejaculation technique (dexmedetomidine) and urethral catheterization. Semen was analyzed in five statuses: 1) fresh semen; 2) post separation by density gradient centrifugation (DGC); 3) post separation by Magnetic-activated sperm sorting (MASS) (non-apoptotic part - NAP); 4) post separation by MASS (apoptotic part - APT) and 5) post separation by MASS followed by DGC (NAP-DGC). Motility was measured using either Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) or optical microscopy, concentration by Neubauer chamber, sperm morphology by wet chamber in phase contrast. Fluorescent probes were used in the evaluation of cell membrane integrity (FITC/IP) and mitochondrial potential (JC-1) in flow cytometry in bovines, in other species a semen smear stained with eosin/nigrosin was performed. In the sperm separation by DGC, 20×10^6 cells were used in a gradient of two layers of 400 μ l each of Percoll at 90% and 45%; after centrifugation at 900 G for 5 minutes the pellet was diluted in HEPES. Sperm separation by MASS used 10×10^6 cells diluted in 1.5 ml of HEPES, followed by centrifugation at 300 G for 10 min. The pellet was resuspended in 150 μ l HEPES and 20 μ l of nanoparticles bound to annexin V were added; after incubation for 15 minutes at room temperature, filtration was carried out in the MiniMacs™ or MASS (prototype in patent application). The NAP fraction was collected in a 2 mL tube and the APT fraction connected to the microspheres was collected by removing the magnet column and adding 300 μ l of HEPES. The spermatid separation by MASS followed by DGC was a combination of the two methodologies. Results were presented as mean \pm standard error of mean. The data were assessed for normality of residuals by the UNIVARIATE procedure and subjected to the Bartlett test (cattle) and the Shapiro-Wilk test (deer, horses, and cats) to verify homogeneity of the variances. Comparisons between treatments were performed by the MIXED procedure of SAS, and differences between treatments by Tukey's test, with a significance of $p \leq 0.05$. The SEAM and DGC techniques were efficient in reducing sperm abnormalities, removing mainly head and tail defects. In cattle, the combination of the two sperm processing methods (DGC and MASS) was significantly more effective in the production of high-quality sperm samples than using them separately (70% more reduction in abnormalities). Sperm morphology in cattle was similar between fresh (35.04 ± 2.29^a) and APT (30.68 ± 1.94^a) samples, between DGC (21.50 ± 1.47^b) and NAP (17.30 ± 1.10^b) and different for NAP-DGC (10.50 ± 1.46^c), the analyzes of membrane integrity and mitochondrial potential were similar between samples with the exception of APT, which had a decrease of 50% and 20%, respectively. Similar results in morphology were obtained in deer: similar between fresh (41.83 ± 10.25^a) and APT (33.83 ± 8.49^a), between DGC (14.83 ± 3.17^b) and NAP (12 ± 3.01^b) and a drop only in membrane integrity in APT (67%). The same in horses: similar between fresh (43.20 ± 2.78^a) and APT (44.5 ± 2.96^a) and between DGC (15.6 ± 2.10^b) and NAP (24.30 ± 1.63^b), membrane integrity was similar in the DGC and NAP samples, with a 30% increase over fresh and a more than 50% reduction in APT. In cats, the result was varied with similarity between fresh (47.9 ± 4.47^a) and APT (43.0 ± 5.16^{ab}) and this with NAP (29.8 ± 4.90^{ab}) and different of DGC (15.4 ± 0.95^c), with difference in membrane integrity only in APT (13% decrease). In those three species, the motility of the post MASS samples was low, perhaps due to the greater sensitivity of the spermatid cell in the species, the number of procedures to which the cell was submitted, and the large time spent in the analyses. Those findings suggest that that nanotechnological method is efficient in the production of high-quality semen samples for assisted reproduction procedures in both domestic and wild animals, but further studies are still needed to better understand the particular characteristics of the spermatid cells of each species, in order to improve the results of the technique.

Keywords: Animal reproduction, andrology, fertility, semen, domestic animals, cervids.

Full research at: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36304>.

Videocistoscopia em *Lutra longicaudis*: Relato de caso

Sara Maria Nascimento de Jesus^{1*}, Carolina Hori Venturim da Frota¹, Gabriela Santana dos Anjos¹, Carlos Alberto Cardoso Neto¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Natália Borges Miranda¹, Taíres dos Santos Rodrigues², Marcos Santos Pereira², Marcus Vinicius Galvão Loiola³, Marcos Chalhoub Coelho Lima³, Adamas Tassinari Bonfada⁴

¹Graduando do curso de Medicina Veterinária - UFBA, Salvador, BA, Brasil; ²Residente do Programa de Residência em Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária - UFBA, Salvador, BA, Brasil; ³Professor do curso de Medicina Veterinária - UFBA, Salvador, BA, Brasil; ⁴Médico Veterinário do setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária – UFBA, Salvador, BA, Brasil
*e-mail: sara.maria@ufba.br

O exame de videocistoscopia vem ganhando espaço na medicina veterinária e consiste em observação da uretra e bexiga com a mínima invasão, além da possibilidade de realizar biópsias e tratamentos. O exame é indicado em casos de cistite crônica, hematúria, polaciúria, cálculos, incontinência urinária, traumas e alterações do fluxo urinário. Foi atendida Instituto Mamíferos Aquáticos de Salvador (Bahia), um animal da espécie *Lutra longicaudis*, de nome popular lontra-neotropical, macho, com suspeita de obstrução uretral devido a retenção urinária. Para prosseguir com o diagnóstico e coletar material biológico, o paciente foi submetido a anestesia geral inalatória com isoflurano. Com o paciente em plano anestésico adequado foi realizada uma videocistoscopia utilizando fibroscópio flexível contendo 3,7 mm de diâmetro e 57 cm de comprimento. A passagem do fibroscópio foi realizada através da uretra peniana, infundindo solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%, até sua chegada na bexiga. Observou-se uma área de coloração esbranquiçada na região do colo vesical e outra área muito semelhante em região do ápice vesical. Na região do colo vesical, havia também fragmentos de tecidos aparentemente necróticos. Não foi possível visualizar os ureteres. Foi coletado material para biópsia, cultura bacteriana e antibiograma. O resultado da cultura foi negativo e o resultado da biópsia ainda estava em processamento até o momento da confecção deste artigo. O animal teve óbito aos sete dias após o procedimento provavelmente devido a dificuldade em esvaziar a bexiga (possivelmente alguma causa neurológica por atonia vesical). A videocistoscopia foi importante para identificar as lesões na bexiga, determinando o tamanho e a gravidade, além disso a videocistoscopia permitiu a coleta de material com mínimo trauma, sem a necessidade de cirurgia.

Palavras-chaves: videocistoscopia, *Lutra longicaudis*, retenção, urinária

Videocystoscopy in *Lutra longicaudis*: Case report

Sara Maria Nascimento de Jesus¹, Carolina Hori Venturim da Frota¹, Gabriela Santana dos Anjos¹, Carlos Alberto Cardoso Neto¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Natália Borges Miranda¹, Taíres dos Santos Rodrigues², Marcos Santos Pereira², Marcus Vinicius Galvão Loiola³, Marcos Chalhoub Coelho Lima³, Adamas Tassinari Bonfada⁴

¹Graduando do curso de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ²Residente do Programa de Residência em Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ³Professor do curso de Medicina Veterinária, UFBA, Salvador, BA, Brasil; ⁴Médico Veterinário do setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária
*e-mail: sara.maria@ufba.br

The videocystoscopy examination has been gaining ground in veterinary medicine and consists of observing the urethra and bladder with minimal invasion, in addition to the possibility of performing biopsies and treatments. The test is indicated in cases of chronic cystitis, hematuria, pollakiuria, uroliths, urinary incontinence, trauma and changes in urinary flow. An animal of the species *Lutra longicaudis*, popularly known as the neotropical otter, male, was treated at the Aquatic Mammal Institute of Salvador (Bahia), with suspected urethral obstruction due to urinary retention. To proceed with the diagnosis and collect biological material, the patient underwent general inhalational anesthesia with isoflurane. With the patient in an adequate anesthetic plane, a videocystoscopy was performed using a flexible fiberoptic measuring 3.7 mm in diameter and 57 cm in length. The fiberoptic was passed through the penile urethra, infusing a sterile 0.9% NaCl saline solution until it reached the bladder. A whitish area was observed in the region of the bladder neck and another very similar area in the region of the bladder apex. In the region of the bladder neck, there were also fragments of apparently necrotic tissue. It was not possible to visualize the ureters. Material for biopsy, bacterial culture and antibiogram was collected. The culture result was negative and the biopsy result was still being processed at the time of writing this article. The animal died seven days after the procedure, probably due to difficulty in emptying the bladder (possibly some neurological cause due to bladder atony). Videocystoscopy was important to identify lesions in the bladder, determining size and severity, in addition, videocystoscopy allowed the collection of material with minimal trauma, without the need for surgery.

Keywords: videocystoscopy, *Lutra longicaudis*, urinary, retention