

Agravamento da severidade da degeneração testicular induzida por insulação escrotal em ovino acometido por dermatite escrotal - Relato de caso

Paula Zanin Rattes¹, Renan Denadai¹, Luiz Gustavo Ferreira de Lima¹, Luan Sitó da Silva¹, Jéssica Modesto¹, Franciele de Oliveira Campos¹, Giovanna Fernandes da Costa¹, Eunice Oba¹, João Carlos Pinheiro Ferreira^{1*}

¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil

*e-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

Para desempenhar suas funções fisiológicas, os testículos ovinos permanecem 3 a 5 °C abaixo da temperatura corporal. Quando a temperatura testicular se eleva acima desta faixa, instala-se o quadro de estresse térmico testicular (ET), que reduz a qualidade seminal e a fertilidade dos animais. Afecções que resultem no aumento da temperatura testicular, como orquites, periorquites, epididimites e dermatites escrotais, promovem ET e degeneração testicular. O objetivo deste resumo é descrever um caso de degeneração testicular agravada por dermatite escrotal em ovino submetido à insulação escrotal. Oito carneiros (Dorper x Santa Inês) de 16 meses de idade, foram submetidos à insulação escrotal por 72 h utilizando-se bolsas de aquecimento escrotal validadas para ovinos. Três dias antes do início da insulação, considerado como dia 0 (D = 0), as superfícies escrotais cranial e caudal foram tricotomizadas. Nos D-1, D3, D5 e D7 foram realizadas aferições da temperatura retal (TR - termômetro clínico) e da superfície escrotal caudal (TSE - termografia infravermelha) e determinando o valor médio bilateral das TSE, considerando-se as regiões proximal, média e distal. Adicionalmente, foram realizadas mensurações dos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) das artérias testiculares (ultrassonografia Doppler triplex). Nos D-1, D7, D14 e D20, amostras de sêmen foram colhidas (vagina artificial) para a avaliação das motilidades espermáticas total (MT) e progressiva (MP), que no D-1 foram em média, respectivamente, 95,1 e 67% e avaliação da morfologia dos espermatozoides em preparações úmidas (microscopia diferencial de fase), que indicou 96% de normalidade (defeitos menores [Dm] e maiores [DM], respectivamente, 2 e 2%). No momento da retirada das bolsas de aquecimento, diferente dos demais, um carneiro apresentava dermatite escrotal severa, caracterizada por hiperemia e aumento da sensibilidade dolorosa da superfície escrotal, e febre (TR ~40,5°C), que persistiu por 48 h. A partir do D20, este carneiro apresentou importante redução das MT (2%) e MP (0%) e apenas 59% de espermatozoides morfolologicamente normais (Dm e DM, respectivamente, 22% e 19%). Nesse momento, os demais apresentavam valores médios de MT e MP, respectivamente, de 85% e 55,6%, e 85% de células morfolologicamente normais (Dm e DM, respectivamente, 12% e 3%). No D20, o animal também apresentou diminuição do tónus testicular (Flacidez grau 2; escala de 0 a 3), diferente dos demais que apresentavam consistência fibro-elástica (ausência de flacidez; grau 0). A partir do D3, o carneiro afetado também apresentou progressivo aumento da TSE, tendo sido registrada no D7 35,9°C, valor 1,5°C superior a TSE média dos demais. Adicionalmente, no D5, o carneiro com dermatite escrotal apresentou IR (0,71) e IP (1,127) da artéria testicular maiores que a média dos demais animais (respectivamente, 0,55 e 0,87), demonstrando que apresentava menor fluxo sanguíneo testicular. O presente relato demonstra que a dermatite elevou a temperatura escrotal e desencadeou um quadro febril, condições que potencializam os efeitos da insulação escrotal causando severa degeneração testicular.

Palavras-chaves: Ovinos; Estresse térmico testicular; Afecções escrotais; Qualidade seminal

Agradecimentos: À toda equipe de trabalho e colaboradores e às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, fomento nº 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2020/15556-8, 2021/11898-4) e à Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPE, Edital 13/2022).

Worsening of the severity of testicular degeneration induced by scrotal insulation in a sheep affected by scrotal dermatitis - Case report

Paula Zanin Rattes¹, Renan Denadai¹, Luiz Gustavo Ferreira de Lima¹, Luan Sitó da Silva¹, Jéssica Modesto¹, Franciele de Oliveira Campos¹, Giovanna Fernandes da Costa¹, Eunice Oba¹, João Carlos Pinheiro Ferreira^{1*}

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

*e-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

To perform their physiological functions, rams' testicles should remain 3 to 5°C below body temperature. When testicular temperature rises above this range, testicular heat stress (HS) occurs, which reduces seminal quality and animal fertility. Conditions that increase testicular temperatures, such as orchitis, periorchitis, epididymitis, and scrotal dermatitis, can promote HS and testicular degeneration. Our objective was to describe a case of testicular degeneration aggravated by scrotal dermatitis in a sheep subjected to scrotal insulation. Eight 16-month-old crossbred (Dorper x Santa Inês) rams were subjected to scrotal insulation for 72 hours using scrotal heating bags validated for sheep. Three days before the start of insulation, considered day 0 (D = 0), the cranial and caudal scrotal surfaces were shaved. On D-1, D3, D5, and D7, rectal temperature (RT - clinical thermometer) and caudal scrotal surface temperature (SST - infrared thermography - bilateral mean value of proximal, middle, and distal CST), resistivity index (RI), and pulsatility index (PI) of the testicular arteries (triplex Doppler ultrasonography) were measured. On D-1, D7, D14, and D20, semen samples were collected (artificial vagina) for the evaluation of total (MT) and progressive (MP) sperm motility (95.1% and 67%, respectively), and evaluation of sperm morphology in wet preparations (differential phase microscopy), which indicated 96% of normality (minor [Dm] and major [DM] defects, respectively, 2 and 2%). When removing the heating bag, unlike the others, one ram presented severe scrotal dermatitis, characterized by hyperemia, increased scrotal surface pain sensitivity, and fever (RT ~40.5°C) for 48 hours. On D20, this ram presented a sharp reduction in total motility (2%) and PM (0%), and only 59% of morphologically normal spermatozoa (Dm and DM, respectively, 22% and 19%). At that time, the others had mean values of MT and MP of 85% and 55.6%, respectively, and 85% of morphologically normal cells (Dm and DM, respectively, 12% and 3%). On D20, this animal also presented a decrease in testicular tone (grade 1 of testicular flaccidity, scale 0-3), different from the others that presented fibroelastic consistency (grade 0). From D3, the affected ram also showed a progressive increase in SST, reaching 35.9°C on D7, 1.5°C higher than the mean CST of the other rams. Additionally, on D5, the ram with scrotal dermatitis had a higher resistance index (0.71) and pulsatility index (1.127) of the testicular artery than the mean value of the other animals (0.55 and 0.87, respectively), displaying lower testicular blood flow. This report demonstrates that dermatitis raised scrotal temperature and triggered a fever, conditions that potentiated scrotal insulation's effects, causing severe testicular degeneration.

Keywords: Ovine; testicular heat stress; scrotal affections; semen quality

Acknowledgments: We would like thanks to the team of researchers and collaborators, as well as the funding agencies, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Grant # 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grants # 2020/15556-8 and 2021/11898-4), and the PROPe-Unesp, Grant # 13/2022).

Avaliação da susceptibilidade dos espermatozoides de carneiros a diferentes desafios oxidativos

Raphaela Gabrielle Brito Sousa^{1*}, João Diego de Agostini Losano², Mônica Degraf Cavallin¹, Roberta Ferreira Leite¹, Ricardo Yuji Kamimura Inoue¹, Felipe Keidy Shimizu¹, Ken Kawaoka Nagai¹, Henrique Thomazo Frias¹, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'avila Assumpção¹, Marcilio Nichi¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

²University of Florida (UFL)

*e-mail: rgbsousa@usp.br

O desequilíbrio fisiológico e bioquímico que ocorre durante a aplicação de biotecnologias reprodutivas ou mesmo na monta natural pode resultar em danos aos espermatozoides, diminuição da motilidade, comprometimento do acrossoma e da membrana plasmática e redução do metabolismo. Essas alterações podem levar à redução da viabilidade espermática e da capacidade fecundante. O desequilíbrio bioquímico mais importante é representado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) e pela redução dos mecanismos antioxidantes que caracterizam o estresse oxidativo. terapia antioxidante. No entanto, o oxidante escolhido para tal terapia pode influenciar fortemente os resultados; diferentes espécies reativas de oxigênio são destruídas por diferentes antioxidantes. Portanto, o objetivo do presente estudo é identificar as espécies reativas de oxigênio mais deletérias no esperma ovino. Amostras seminais de sete carneiros foram coletadas com vagina artificial e diluídas com Optixcell. Cada ejaculado foi então dividido em cinco alíquotas e incubado com três sistemas de produção de ROS (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila) e um com cadeia de peroxidação lipídica (MDA). Uma alíquota foi incubada como controle, após a incubação, as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática assistida por computador (CASA), integridade acrossômica (Fast Green/Bengal Rose), integridade da membrana plasmática (Eosina/Nigrosina), integridade da membrana plasmática e acrossômica (FITC -PSA), atividade mitocondrial (3'3 Diaminobenzidina), potencial de membrana mitocondrial (JC1), estado oxidativo (CellRox®) e suscetibilidade à peroxidação lipídica (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS). A análise estatística foi realizada utilizando o SAS System for Windows com valor significativo (p) inferior a 0,05. As características da cinética espermática (motilidade $27,43 \pm 4,13b$) revelaram forte influência deletéria do peróxido de hidrogênio sendo o único grupo diferente e houve redução no outro. Por outro lado, o radical hidroxila prejudicou muito a atividade mitocondrial onde vemos um aumento significativo no DAB IV $12,29 \pm 2,65^a$ diferindo dos outros grupos. Além disso, o radical hidroxila levou à maior peroxidação lipídica (TBARS $2086,20 \pm 67,14^a$) e aumentou a porcentagem de células com acrossoma e membrana danificados. Concluímos que tanto o peróxido de hidrogênio quanto o radical hidroxila foram os mais deletérios, indicando que uma combinação de antioxidantes pode ser uma alternativa interessante para evitar danos oxidativos em espermatozoides ovinos.

Palavras-chave: incubado, peroxidação, deletério, terapia, antioxidante.

Evaluation of ram sperm susceptibility to different oxidative challenges

Raphaella Gabrielle Brito Sousa^{1*}, João Diego de Agostini Losano², Mônica Degraf Cavallin¹, Roberta Ferreira Leite¹, Ricardo Yuji Kamimura Inoue¹, Felipe Keidy Shimizu¹, Ken Kawaoka Nagai¹, Henrique Thomazo Frias¹, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'avila Assumpção¹, Marcilio Nichi¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

²University of Florida (UFL)

*e-mail: rgbsousa@usp.br

The physiological and biochemical imbalance that occurs while applying reproductive biotechnologies or even in the natural mount can result in sperm damages, decreased motility, impaired acrosome and plasma membrane and reduced metabolism. These changes may lead to reduced sperm viability and fecundating ability. The most important biochemical imbalance is represented by the excessive production of reactive oxygen species (ROS) and the reduction of the antioxidant mechanisms which characterizes the oxidative stress. This condition, known to lead to decreased fertility and decreased sperm fecundating capacity, may be avoided by an antioxidant therapy. However, the oxidant chosen for such therapy may highly influence the outcomes; different reactive oxygen species are destroyed by different antioxidants. Therefore, the aim of the present study is to identify the most deleterious reactive oxygen species sheep sperm. Seminal samples of seven rams were collected with an artificial vagina and diluted with Optixcell. Each ejaculate was then divided in five aliquots and incubated with three ROS production systems (superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical) and one with lipid peroxidation chain (MDA). An aliquot was incubated as a control, after incubation, samples were evaluated for computer-assisted sperm kinetics (CASA), acrosomal integrity (Fast Green/ Bengal Rose), plasma membrane integrity (Eosin/Nigrosin), plasma and acrosomal membrane integrity (FITC-PSA), mitochondrial activity (3'3 Diaminobenzidine), mitochondrial membrane potential (JC1), oxidative status, (CellRox®), and susceptibility to lipid peroxidation (Thiobarbituric Acid Reactive Substances/TBARS). Statistical analysis was performed using SAS System for Windows with a significant value (p) less than 0,05. The sperm kinetics (motility $27,43 \pm 4,13^b$) characteristics revealed a strong deleterious influence of hydrogen peroxide being the only group that was different and there was a reduction in the other. On the other hand, hydroxyl radical highly impaired mitochondrial activity where we see a significant increase in DAB IV $12,29 \pm 2,65^a$ differing from other groups. Furthermore, hydroxyl radical lead to the highest lipid peroxidation (TBARS 2086.20 ± 67.14^a) increased percentage of cells showing both damaged acrosome and membrane. We conclude both hydrogen peroxide and hydroxyl radical were the most deleterious, indicating that a combination of antioxidants may be an interesting alternative to avoid oxidative damages in ram sperm.

Keywords: incubated, peroxidation, deleterious, therapy, antioxidant.

Correlação da Dopplervelocimetria da artéria testicular e avaliação espermática de carneiros jovens da raça White Dorper

Luiz Guilherme Corsi Trautwein^{1*}, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Ana Beatriz Marques de Almeida¹, Giulia Maria Rodrigues², Pedro Segabinazzi², Thales Ricardo Rigo Barreiros², Maria Isabel Mello Martins¹

¹Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. ²Universidade Estadual do Norte do Paraná, Bandeirantes, Paraná, Brasil

*e-mail: lgct@uel.br

A perfusão sanguínea adequada dos testículos, fornecida por meio da artéria testicular, é necessária para que ocorra a adequada espermatogênese. A artéria testicular descende diretamente da aorta caudal, passa pelo anel inguinal e torna-se convoluta em relação ao plexo pampiniforme para que haja troca de calor contracorrente e diminuição da velocidade sanguínea, antes de adentrar ao parênquima testicular. Caso a velocidade sanguínea arterial seja elevada, poderá predispor a uma ineficiente perfusão sanguínea testicular, levando a uma espermatogênese inadequada e, conseqüentemente, pior qualidade seminal. É possível avaliar a hemodinâmica da artéria testicular por meio de análise ultrassonográfica Doppler. Sendo assim, o objetivo foi aferir a Dopplervelocimetria da artéria testicular de carneiros White Dorper e correlacioná-la com a cinética espermática obtida pelo sistema CASA. Foram utilizados seis carneiros White Dorper, submetidos à avaliação em dois tempos distintos: T1 com 11 meses de idade e T2 com 12 meses de idade. Em ambos os tempos os animais foram submetidos à avaliação Dopplervelocimétrica (probe linear de 7 mHz, Sonoscape S6v, Shenzhen, China) da artéria testicular nas regiões suprastesticular distal e suprastesticular média, à qual foram aferidas a velocidade de pico sistólico (VPS), velocidade diastólica final (VDF), índice de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP). Para as avaliações hemodinâmicas a frequência de repetição de pulso ultrassônico (PRF) e o ganho foram ajustados individualmente, assim como a angulação de Doppler pulsado inferida sempre foi menor que 60°. Os animais foram submetidos à colheita de sêmen por eletroejaculação (Eletrojet, Valinhos, Brasil), com estímulos curtos, de 1 segundo e 250 mA, até a ereção e estímulos de 3 a 5 segundos até a ejaculação. O sêmen a fresco foi avaliado subjetivamente em microscópio óptico, refrigerado após diluição com Botubov (Botupharma, Botucatu, Brasil) e, após cerca de duas horas, a cinética espermática foi avaliada no sistema CASA (IVOS II, Hamilton Thorne, Beverly, EUA). A integridade de membrana e morfologia espermática foram avaliadas por meio do teste de eosina-nigrosina após a contagem de 200 células. Para a análise estatística foram utilizados testes t de Student, quando comparados dois grupos distintos, teste t pareado quando comparados grupos em relação aos tempos, e correlação de Pearson entre as variáveis Doppler e de avaliação espermática. Não houve diferença nas variáveis Doppler velocimétricas entre os testículos esquerdo e direito, por isso, para as comparações relacionadas aos tempos e às análises de sêmen, foi utilizada uma média das variáveis entre testículos esquerdo e direito. Houve diferença entre as regiões suprastesticular distal e suprastesticular média, sendo VPS ($14,6 \pm 3,25$; $24,8 \pm 3,93$; valor de $p = < 0,001$); VDF ($7,8 \pm 1,8$; $4,8 \pm 2,3$; valor de $p = < 0,001$); IR ($0,45 \pm 0,15$; $0,79 \pm 0,1$; valor de $p = < 0,001$); IP ($0,48 \pm 0,28$; $1,13 \pm 0,28$; valor de $p = < 0,001$). Houve um aumento do IR entre o T1 e T2 da região suprastesticular distal ($0,39 \pm 0,11$; $0,51 \pm 0,16$; valor de $p = 0,017$) e da região suprastesticular média ($0,36 \pm 0,09$; $0,50 \pm 0,16$; valor de $p = 0,020$). Não houve diferença entre o VPS, VDF e IP nas regiões suprastesticular distal e média entre T1 e T2. Houve correlação entre as variáveis Doppler da região suprastesticular distal, sendo elas: VPS e integridade de membrana ($r = -0,695$; $p = 0,0121$); PSV e batimento flagelar cruzado (BCF; $r = 0,587$; $p = 0,049$); VDF e turbilhonamento ($r = 0,712$; valor de $p = 0,009$); IR e integridade de membrana ($r = -0,664$; $p = 0,0184$); IR e turbilhonamento ($r = -0,613$; valor de $p = 0,034$); IP e integridade de membrana ($r = -0,636$; valor de $p = 0,022$). Na região suprastesticular média houve correlação entre a VPS e a linearidade ($r = -0,61$; valor de $p = 0,035$). Não houve correlação entre as demais variáveis. Ao conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho correlacionando a análise Doppler da artéria testicular das regiões suprastesticular distal e média com a avaliação e cinética espermática. A Dopplervelocimetria tem se mostrado uma eficiente técnica auxiliar ao exame andrológico, na qual é possível avaliar a hemodinâmica vascular testicular e do cordão espermático, já demonstrada em diversas espécies de animais domésticos e no homem. É sabido que o testículo necessita de perfusão sanguínea constante e, por isso, o envelhecimento arterial em contato com o plexo pampiniforme auxilia, além da troca de calor contracorrente, na diminuição da resistividade arterial, especialmente quando a artéria adentra ao testículo. Essa diminuição na resistividade arterial é importante para que haja uma correta perfusão de oxigênio tecidual, corroborado pela correlação negativa encontrada entre a resistividade da região suprastesticular distal e a integridade de membrana e o turbilhonamento. Conclui-se que a Doppler velocimetria da artéria testicular pode auxiliar no exame andrológico de carneiros, assim como há um aumento na velocidade do sangue conforme há a maturidade sexual nos ovinos.

Palavras-chave: Doppler, ultrassonografia, sistema CASA, ovinos, avaliação de sêmen

Correlation of Doppler velocimetry of the testicular artery and sperm evaluation of young White Dorper rams

Luiz Guilherme Corsi Trautwein^{1*}, Myrian megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Ana Beatriz Marques de Almeida¹, Giulia Maria Rodrigues², Pedro Segabinazzi², Thales Ricardo Rigo Barreiros², Maria Isabel Mello Martins¹

¹ State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. ² State University of Northern Paraná, Bandeirantes, Paraná, Brazil
*e-mail: lgct@uel.br

Adequate blood perfusion of the testes, supplied through the testicular artery, is necessary for proper spermatogenesis to occur. The testicular artery descends directly from the caudal aorta, passes through the inguinal ring and becomes convoluted to the pampiniform plexus, so that there is countercurrent heat exchange and a decrease in blood velocity, before entering the testicular parenchyma. If the arterial blood velocity is high, it may predispose to inefficient testicular blood perfusion, leading to inadequate spermatogenesis and, consequently, worse seminal quality. It is possible to evaluate the hemodynamics of the testicular artery using Doppler ultrasonographic analysis. Therefore, the objective was to measure the Doppler velocimetry of the testicular artery of White Dorper rams and correlate it with the sperm kinetics obtained by the CASA system. Six White Dorper rams were used and submitted to evaluation at two different times: T1 at 11 months of age and T2 at 12 months of age. At both times, the animals were submitted to a Doppler velocimetric evaluation (7 MHz linear probe, Sonoscape S6v, Shenzhen, China) of the testicular artery in the distal suprastesticular and middle suprastesticular regions, from which the peak systolic velocity (SPV), velocity end-diastolic (EDV), resistivity index (RI) and pulsatility index (PI). For the hemodynamic evaluations, the ultrasonic pulse repetition frequency (PRF) and the gain were adjusted individually, as well as the inferred pulsed Doppler angle was always less than 60°. The animals were submitted to semen collection by electroejaculation (Eletrojet, Valinhos, Brazil), with short stimuli of 1 second and 250 mA, until erection and stimuli of 3 to 5 seconds until ejaculation. Fresh semen was subjectively evaluated under an optical microscope, refrigerated after dilution with Botubov (Botupharma, Botucatu, Brazil) and, after about two hours, sperm kinetics was evaluated using the CASA system (IVOS II, Hamilton Thorne, Beverly, USA). Membrane integrity and sperm morphology were evaluated using the eosin-nigrosin test after counting 200 cells. For statistical analysis, Student's t-test was used when comparing two different groups, paired t-test when comparing groups in terms of time, and Pearson's correlation between Doppler and sperm evaluation variables. There was no difference in velocimetric Doppler variables between the left and right testicles, therefore, for comparisons related to time and semen analysis, an average of the variables between the left and right testicles was used. There was a difference between the distal suprastesticular and middle suprastesticular regions, being PSV (14.6 ± 3.25 ; 24.8 ± 3.93 ; p-value = < 0.001); EDV (7.8 ± 1.8 ; 4.8 ± 2.3 ; p-value = < 0.001); RI (0.45 ± 0.15 ; 0.79 ± 0.1 ; p-value = < 0.001); PI (0.48 ± 0.28 ; 1.13 ± 0.28 ; p-value = < 0.001). There was an increase in RI between T1 and T2 in the distal suprastesticular region (0.39 ± 0.11 ; 0.51 ± 0.16 ; p-value = 0.017) and in the middle suprastesticular region (0.36 ± 0.09 ; 0.50 ± 0.16 ; p-value = 0.020). There was no difference between PSV, VDF and PI in the distal and middle suprastesticular regions between T1 and T2. There was a correlation between the Doppler variables of the distal suprastesticular region, namely: PSV and membrane integrity ($r = -0.695$; p = 0.0121); PSV and cross-flagellar beat (BCF; $r = 0.587$; p = 0.049); EDV and swirling ($r = 0.712$; p-value = 0.009); IR and membrane integrity ($r = -0.664$; p = 0.0184); IR and eddying ($r = -0.613$; p-value = 0.034); IP and membrane integrity ($r = -0.636$; p-value = 0.022). In the middle suprastesticular region, there was no correlation between PSV and linearity ($r = -0.61$; p-value = 0.035). There was no correlation between the other variables. To the authors' knowledge, this is the first work correlating the Doppler analysis of the testicular artery of the distal and middle suprastesticular regions with sperm evaluation and kinetics in rams. Doppler velocimetry has proven to be an efficient auxiliary technique for andrological examination, in which it is possible to assess testicular and spermatid cord vascular hemodynamics, already demonstrated in several species of domestic animals and man. It is known that the testicle needs constant blood perfusion; therefore, arterial coiling in contact with the pampiniform plexus helps, in addition to countercurrent heat exchange, decrease arterial resistivity, especially when the artery enters the testicle. This decrease in arterial resistivity is important for correct tissue oxygen perfusion, corroborated by the negative correlation found between resistivity in the distal suprastesticular region and membrane integrity and turbulence. It is concluded that Doppler velocimetry of the testicular artery can help in the andrological examination of rams, as well as there is an increase in blood velocity as there is sexual maturity in sheep.

Keywords: Doppler, ultrasonography, CASA system, sheep, semen evaluation

Desenho e validação de um instrumento de pesquisa para determinar a viabilidade do uso de sêmen sexado em sistemas de produção ovina

Jackie Michelle Peña Rodriguez¹, Jaime Andres Cubides Cardenas², Shirley Andrea Florez Rodriguez¹

¹Semillero de investigación en salud reproductiva y fertilidad animal (SISARF), grupo de investigación en Zootecnia (GIZU).

Programa de Zootecnia, Universidad de Cundinamarca, seccional Ubaté

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia, Centro de investigación Tibaitatá, Laboratorio de salud animal y microbiología pecuaria, Grupo GIISBA, Cundinamarca, Colombia

*e-mail: sandreaflomez@ucundinamarca.edu.co

Atualmente, o sêmen sexado de ovinos tornou-se um produto comercialmente disponível, mas seu uso se difundiu em países como Estados Unidos, Europa, Austrália e Nova Zelândia. Essa biotecnologia oferece aos produtores a oportunidade de direcionar seu programa de criação para a produção de cordeiros de um sexo específico, o que pode ser benéfico para atender às demandas do mercado e otimizar o manejo do rebanho. Para sua implementação em unidades de produção de ovinos na Colômbia, é importante avaliar a capacidade tecnológica dos sistemas de produção e a percepção ou convicções do produtor sobre o uso desta biotecnologia, para a qual foi desenvolvido e validado um instrumento para coletar informações sobre o uso de sêmen sexado em sistemas de produção de ovinos, incluindo a avaliação da capacidade tecnológica e das percepções e necessidades dos produtores. Este estudo é de natureza exploratória e descritiva e tem como objetivo principal validar um instrumento de coleta de dados que permita mensurar a viabilidade do uso de sêmen sexado de carneiros na ovinocultura. O processo de validação do instrumento utilizou o método de verificação quantitativa para medir a confiabilidade e validade dos indicadores estabelecidos na pesquisa. A pesquisa semiestruturada é composta por 35 questões relacionadas à unidade produtiva, capacidade tecnológica e percepções e necessidades do produtor quanto ao uso do sêmen sexado. Para validar o instrumento, a pesquisa foi enviada a cinco especialistas na área de ciências agrárias, que avaliaram cada questão em uma escala de 1 a 5 de acordo com três critérios: 1. Clareza (se a questão for clara e simples para o leitor), 2. Relevância (se a pergunta for essencial ou relevante para o objetivo) e 3. Objetividade (se a pergunta não for tendenciosa, mas neutra). Foram realizadas estatísticas descritivas (média e desvio padrão), teste de concordância (coeficiente Kappa de Cohen) e análise Alpha de Cronbach para consistência interna. A clareza das questões obteve uma pontuação de $3,8 \pm 0,34$, a relevância teve uma pontuação de $3,87 \pm 0,38$ e a validade de $3,84 \pm 0,31$, onde o coeficiente Kappa de Cohen indicou uma baixa concordância para alguns itens, da mesma forma, uma redundância foi notada quando se encontrou o Alfa de Cronbach de 0,983. Após a análise, foram feitas modificações nos itens redundantes e com pouca concordância para finalizar o instrumento. Do processo, os especialistas nos dizem que é importante revisar cuidadosamente a linguagem usada nas perguntas da pesquisa para garantir que sejam claras e compreensíveis para o público-alvo, a fim de maximizar a qualidade dos dados obtidos. Limitar o número de perguntas eliminando perguntas com contexto repetido para evitar a fadiga do respondente e melhorar a precisão das respostas, além disso, direcionar as perguntas do ponto de vista tecnológico, econômico e social, eliminando perguntas associadas a indicadores que não são necessários para o estudar.

Palavras-chave: Criação de ovinos, sexagem espermática, percepções do produtor

Design and validation of a survey instrument to determine the feasibility of using sexed semen in sheep production systems.

Jackie Michelle Peña Rodríguez¹, Jaime Andres Cubides Cardenas², Shirley Andrea Florez Rodriguez¹

¹Semillero de investigación en salud reproductiva y fertilidad animal (SISARF), grupo de investigación en Zootecnia (GIZU).
Programa de Zootecnia, Universidad de Cundinamarca, seccional Ubaté.

²Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia, Centro de
investigación Tibaitatá, Laboratorio de salud animal y microbiología pecuaria, Grupo
GIISBA, Cundinamarca, Colombia

*e-mail: sandreaflomez@ucundinamarca.edu.co

Currently, sexed sheep semen has become a commercially available product, but its use is widespread in countries such as the United States, Europe, Australia and New Zealand. This biotechnology provides producers with the opportunity to direct their breeding program towards the production of lambs of a specific sex, which can be beneficial to meet market demands and to optimize flock management. For its implementation in sheep production in Colombia, it is important to evaluate the technological capabilities of the production systems and the producer's perception or convictions regarding the use of this biotechnology. For this purpose, an instrument was developed and validated to collect information on the use of sexed semen in sheep production systems, including the evaluation of technological capabilities and the perceptions and needs of the producers. This study is exploratory and descriptive in nature, and its main objective is to validate a data collection instrument to measure the feasibility of using sexed semen in the sheep industry. The instrument validation process used the quantitative testing method to measure the reliability and validity of the indicators established in the survey. The semi-structured survey consisted of 35 questions related to the production unit, technological capabilities and the producer's perceptions and needs regarding the use of sexed semen. To validate the instrument, the survey was sent to five experts in the area of agricultural sciences, who evaluated each question on a scale of 1 to 5 according to three criteria: 1. Clarity (if the question is clear and simple for the reader), 2. Descriptive statistics (mean and standard deviation), a concordance test (Cohen's Kappa Coefficient) and for internal consistency Cronbach's Alpha analysis were performed. The clarity of the questions obtained a score of 3.8 ± 0.34 , relevance had a score of 3.87 ± 0.38 and validity of 3.84 ± 0.31 , where, the Cohen's Kappa coefficient indicated a low concordance for some items, likewise, redundancy was noted when a Cronbach's Alpha of 0.983 was found. After the analyses, modifications were made to the redundant items and those with low concordance in order to finalize the instrument. From the process, the experts informed us that it is important to carefully review the language used in the survey questions to ensure that they are clear and understandable to the target audience, in order to maximize the quality of the data obtained. Limit the number of questions by eliminating questions with repeated context to avoid respondent fatigue and improve the accuracy of the answers, additionally, address the questions from the target audience, in order to maximize the quality of the data obtained.

Keywords: Ovine husbandry, sperm separation, producer perceptions, sperm separation, producer perceptions

Efeito da adição do ácido palmítico ao diluidor tris-gema na motilidade e termorristência do sêmen ovino descongelado

Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho^{1*}, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva¹, Misael das Virgens Santana², Francisca Gisele de Sousa Santos³, Vanessa Balan Julio³, Marcela Pereira Gualter³, José Adalmir Torres de Souza⁴, Antônio de Sousa Junior⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFPI, Teresina, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, UFPI, Teresina, Brasil

³Programa de Residência Profissional em Saúde - Reprodução Animal, UFPI, Teresina, Brasil

⁴Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, UFPI, Teresina, Brasil

⁵Colégio Técnico de Teresina, UFPI, Teresina, Brasil

*e-mail: marcoscelestino90@gmail.com

A criopreservação de sêmen é uma das principais técnicas de conservação de germoplasma, mas pode gerar danos irreversíveis nas células espermáticas, a exemplo da lipoperoxidação, causada por espécies reativas ao oxigênio (EROs). Para atenuar esses danos e aumentar a qualidade do sêmen criopreservado, é necessário estudar métodos que utilizem antioxidantes associados. O objetivo deste estudo é avaliar a adição do Ácido Palmítico (AP) na manutenção da qualidade do sêmen criopreservado em ovinos. Foram coletadas amostras de sêmen de seis carneiros da raça Dorper clinicamente saudáveis e com os parâmetros andrológicos/seminais normais de acordo com as diretrizes do Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA. Foram realizadas 6 coletas, uma a cada 7 dias e as amostras colhidas foram submetidas individualmente as análises macroscópicas e microscópicas antes da formação do pool, fazendo um total de 6 pools. O pool de sêmen foi expandido em diluidor Tris- Gema com glicerol, dividido em duas alíquotas de 4 mL e acrescido o antioxidante na concentração de 100µM/ml para a formação dos seguintes tratamentos: Controle (Tris-Gema) e T1 (Tris-Gema + AP100 µM). Imediatamente após a formação dos grupos, o sêmen diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,25 mL, e criopreservado em máquina automatizada TK3000. Ao término dessa etapa, as palhetas foram armazenadas em botijão criogênico a uma temperatura de -196°C. Após 15 dias, foi realizado as análises pós-descongelamento da viabilidade espermática e, concomitantemente, teste de termorresistência (TTR) nos tempos: 0, 30, 60, 90 e 120 minutos pós-descongelamento. No estudo utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e o teste não-paramétrico H de Kruskal-Wallis para verificar diferença das médias entre os grupos. Para verificar diferença entre os tempos foi usado o teste não-paramétrico de Friedman e em seguida foi aplicado o *post-hoc* para verificar diferenças em pares. A relação entre as variáveis foi verificada pela correlação não-paramétrica de Spearman. Os dados foram digitados no Excel e analisados no programa *IBM Statistical Package for the Social Sciences versão 20.0*. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Quanto aos resultados do TTR, no T1 não foram observadas diferenças significativas para os valores de motilidade entre os tempos avaliados ($p = 0,198$), diferente do que ocorreu no Controle, onde os valores de motilidade caíram entre os tempos 0 e 120 minutos, apresentando diferenças significativas entre eles ($p = 0,001$) o que seria esperado. Portanto, conclui-se que a adição do ácido palmítico ao diluidor tris-gema é capaz de preservar a qualidade do sêmen criopreservado em ovinos.

Palavras-chave: Sêmen, Antioxidante, Ácido Palmítico

Effect of the addition of palmitic acid to Tris-egg yolk extender on the motility and thermoresistance of thawed ovine semen

Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho^{1*}, Jefferson Hallisson Lustosa da Silva¹, Misael das Virgens Santana², Francisca Gisele de Sousa Santos³, Vanessa Balan Julio³, Marcela Pereira Gualter³, José Adalmir Torres de Souza⁴, Antônio de Sousa Junior⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UFPI, Teresina, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical, UFPI, Teresina, Brasil

³Programa de Residência Profissional em Saúde - Reprodução Animal, UFPI, Teresina, Brasil

⁴Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, UFPI, Teresina, Brasil

⁵Colégio Técnico de Teresina, UFPI, Teresina, Brasil

*e-mail: marcoscelestino90@gmail.com

Semen cryopreservation is one of the main germplasm conservation techniques, but it can cause irreversible damage to sperm cells, such as lipid peroxidation caused by reactive oxygen species (ROS). To attenuate these damages and increase the quality of cryopreserved semen, it is necessary to study methods that use associated antioxidants. The objective of this study is to evaluate the addition of Palmitic Acid (PA) in maintaining the quality of cryopreserved semen in sheep. To do so, semen samples were collected from six clinically healthy Dorper rams with normal andrological/semen parameters according to the CBRA Animal Andrological Examination and Semen Evaluation Manual guidelines. Six collections were made, one every seven days, and the collected samples were individually subjected to macroscopic and microscopic analyses before forming a pool, resulting in a total of 6 pools. The semen pool was expanded in Tris-Yolk extender with glycerol, divided into two aliquots of 4 mL, and the antioxidant was added at a concentration of 100uM/ml to form the following treatments: Control (Tris-Yolk) and T1 (Tris-Yolk + 100 μ M PA). Immediately after forming the groups, the diluted semen was packaged in French straws of 0.25 mL and cryopreserved in an automated TK3000 machine. At the end of this stage, the straws were stored in a cryogenic tank at a temperature of -196°C. After 15 days, post-thaw sperm viability analyses were performed, and concomitantly, a thermal resistance test (TTR) was performed at the times: 0, 30, 60, 90, and 120 minutes post-thaw. The study used Analysis of Variance (ANOVA) and the non-parametric Kruskal-Wallis H-test to verify differences in means between groups. The non-parametric Friedman test was used to verify differences between times, and post-hoc was applied to verify differences in pairs. The relationship between variables was verified by non-parametric Spearman's correlation. Data were entered into Excel and analyzed using IBM Statistical Package for the Social Sciences version 20.0. The level of significance adopted was 5% ($p < 0.05$). As for the TTR results, no significant differences were observed for motility values between the evaluated times in T1 ($p=0.198$), unlike in the Control, where motility values decreased between times 0 and 120 minutes, presenting significant differences between them ($p=0.001$), as expected. Therefore, it is concluded that the addition of palmitic acid to the Tris-Yolk extender is capable of preserving the quality of cryopreserved semen in sheep.

Keywords: Semen, Antioxidant, Palmitic Acid

Efeito da renovação de diluente em diferentes temperaturas sobre a integridade acrossomal e integridade funcional da membrana plasmática em sêmen refrigerado de caprinos

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Lorena Ribeiro Silva Andrade¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

³e-mail: larissa@ufrb.edu.br

Apesar da refrigeração seminal prolongar a viabilidade da célula espermática de bode por 48 horas, ao longo do tempo de armazenamento ocorrem alterações no meio associadas ao acúmulo de metabólitos tóxicos que comprometem a viabilidade seminal. A renovação de diluente é uma alternativa para prolongar a viabilidade espermática por promover a substituição desses metabólitos por novos nutrientes. Entretanto, o uso da centrífuga refrigerada limita a execução da técnica, devido ao custo, principalmente. Com o intuito de viabilizar sua execução a campo e avaliar se o uso da centrífuga de bancada à temperatura ambiente (20°C), substituindo a centrífuga refrigerada, resultaria em danos à membrana provocados pelo choque térmico, o objetivo com este estudo foi avaliar o efeito da renovação de diluente em diferentes temperaturas sobre o acrossoma e a integridade funcional da membrana em sêmen refrigerado de caprinos. O projeto foi realizado no setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizada no município de Cruz das Almas, nos meses de maio e junho de 2022. Foram utilizados cinco bodes mestiços adultos, com escore de condição corporal $3,0 \pm 0,5$ (escala 1 a 5), criados em sistema extensivo, em pastagem formada por *Brachiaria decumbens*, com fornecimento de água à vontade. As coletas seminais foram realizadas uma vez por semana, durante cinco semanas consecutivas, por meio de vagina artificial, utilizando uma fêmea estrogonizada como manequim. Imediatamente após a coleta, realizou-se as análises de volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva e vigor espermáticos. Os ejaculados que apresentaram valores dentro do padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, para sêmen fresco, foram agrupados em um *pool*, do qual as características físicas do sêmen foram reavaliados e o *pool* fracionado aleatoriamente em três tratamentos (T) (n=5): T1 - controle, sêmen refrigerado sem renovação de diluente; T2 - sêmen refrigerado com renovação de diluente mediante centrifugação à 800g por 10 minutos, utilizando centrífuga refrigerada (MPW Med. Instruments, Varsóvia, Polônia) à 5°C; e T3 - sêmen resfriado com renovação de diluente mediante centrifugação à 800g por 10 minutos, utilizando centrífuga de bancada (Fanem, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente (20°C). Após fracionamento, realizou-se a diluição com diluente citrato-gema de forma a obter 150 milhões de espermatozoides por dose de 0,25 mL. Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brasil) para curva de resfriamento até 5°C. Após 24, 48 e 72h de refrigeração, foram retiradas alíquotas de cada tratamento para análise de integridade acrossomal por meio da coloração de esfregaços seminais com o corante vermelho congo e avaliação da integridade funcional de membrana utilizando o teste hipoosmótico. Após a retirada das alíquotas, as amostras dos tratamentos com renovação de diluente foram submetidas à centrifugação, de acordo com o tratamento, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* de espermatozoide ressuspenso com novo diluente resfriado à 5°C. Todas as amostras eram armazenadas novamente em Botuflex, sendo os gelos substituídos à cada processamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Às variáveis que apresentaram distribuição normal, foi aplicado a ANOVA e o Teste Tukey. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste Kruskal Wallis ajustado. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as avaliações. Na avaliação da integridade acrossomal 24 horas após a refrigeração, observou-se diferença no percentual ($P < 0,05$), quando T1 apresentou maior ($P < 0,05$) percentual de espermatozoides com acrossoma irregular ($1,20 \pm 0,90\%$) do que T3 ($0,10 \pm 0,22\%$), sendo que T2 foi semelhante ($P > 0,05$) aos demais tratamentos ($0,50 \pm 0,50\%$). Nas horas 48 e 72 não houve diferença entre os tratamentos para integridade acrossomal ($P > 0,05$). Com 72 horas de resfriamento os tratamentos apresentavam os seguintes percentuais para acrossoma íntegro e irregular, respectivamente: T1- $93,80 \pm 4,00\%$, $2,10 \pm 0,82\%$; T2 - $92,70 \pm 1,92\%$, $2,30 \pm 1,09\%$; T3- $91,70 \pm 8,59\%$, $1,60 \pm 1,08\%$. Quanto à integridade da membrana plasmática não foi observada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), nas horas avaliadas. Após 72 horas de refrigeração, os tratamentos apresentaram os seguintes percentuais de células espermáticas com membrana funcionalmente íntegras: T1- $84,90 \pm 6,70\%$; T2- $89,00 \pm 4,88\%$ e T3- $89,00 \pm 4,88\%$. Observa-se que a renovação e a variação na temperatura durante a centrifugação para renovação diária do diluente não afetou a integridade acrossomal, nem a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides de caprinos, refrigerados à 5 °C até 72h.

Palavras-chaves: avaliação espermática; célula espermática, centrifugação seminal

Effect of diluent renewal at different temperatures on acrosomal integrity and functional integrity of the plasma membrane in refrigerated goat semen

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Lorena Ribeiro Silva Andrade¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

Although seminal cooling prolongs goat sperm cell viability for 48 hours, changes in the environment occur during storage associated with the accumulation of toxic metabolites that compromise seminal viability. Diluent renewal is an alternative to prolong sperm viability by promoting the replacement of these metabolites by new nutrients. However, the use of a refrigerated centrifuge limits the execution of the technique, mostly due to cost. Thinking about making its execution feasible in the field and evaluating whether the use of the bench centrifuge at room temperature (20°C), replacing the refrigerated centrifuge, would result in damage to the membrane caused by thermal shock, this study aimed to evaluate the effect of diluent renewal at different temperatures on the acrosome and membrane functional integrity in chilled goat semen. The project was carried out in the goat sector of the Federal University of the Recôncavo of Bahia located in the municipality of Cruz das Almas, Bahia, from May to June 2022. Five adult crossbred goats were used, with a body condition score of 3.0±0.5 (scale 1 to 5), kept in an extensive rearing system on pasture formed by *Brachiaria decumbens*, with *ad libitum* supply of water. Seminal collections were performed once a week, for five consecutive weeks, through an artificial vagina, using an estrogenized female as a dummy. Immediately after collection, analyzes of seminal physical characteristics were performed for volume, aspect, spermatic turbulence, progressive spermatic motility and spermatic vigor. Samples within the standard established by the Brazilian College of Animal Reproduction, for fresh semen, were grouped into a pool, in which the physical characteristics of the semen were reassessed and the pool was randomly fractionated into three treatments (T) (n=5): T1 - control, cooled semen without diluent renewal; T2 – cooled semen with diluent renewal by centrifugation at 800g for 10 minutes using a refrigerated centrifuge (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) at 5°C and T3 – cooled semen with diluent renewal by centrifugation at 800g for 10 minutes using benchtop centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) at room temperature (20 °C). After fractionation, dilution was performed with citrate-yolk diluent in order to obtain 150 million spermatozoa per dose of 0.25 mL. After dilution, the samples were placed in Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brazil) with a cooling curve to 5 °C. After 24, 48 and 72h of the entrance of the samples in the Botuflex, aliquots of each treatment were withdrawn for analysis of acrosomal integrity through the staining of seminal smears with congo red and evaluation of the functional integrity of the membrane using the hyposmotic test. After removing the aliquots, the samples from the treatments with diluent renewal were subjected to centrifugation, according to the treatment, the supernatant discarded and the sperm pellet resuspended with a new diluent cooled at 5 °C. All samples were stored again in Botuflex, whose ices were replaced at each processing. The data was evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. For the variables that presented normal distribution, ANOVA and the Tukey Test were applied. For non-parametric variables, the adjusted Kruskal Wallis test was performed. A significance level of 5% was adopted for all assessments. In the evaluation of acrosomal integrity 24 hours after cooling, there was a difference in the percentage of spermatozoa with irregular acrosome (P<0.05), where T1 presented the highest percentage (1.20±0.90%) and T3 presented the lowest percentage of spermatozoa with irregular acrosome (0.10±0.22%). While T2 did not differ from the other treatments (0.50±0.50%). At hours 48 and 72, there was no difference among treatments for acrosomal integrity (P>0.05). With 72 hours of cooling, the treatments presented the following percentages for intact and irregular acrosome, respectively: T1- 93.80±4.00%, 2.10±0.82%; T2 – 92.70±1.92%, 2.30±1.09%; T3- 91.70±8.59%, 1.60±1.08%. As for the integrity of the plasmatic membrane, no difference was observed among the treatments (P>0.05), in the evaluated hours. At hour 72 of cooling, the treatments had the following percentages of sperm cells with functionally intact membranes: T1- 84.90±6.70%; T2- 89.00±4.88% and T3- 89.00±4.88%. It is observed that the renewal and variation in temperature during centrifugation for daily renewal of the diluent affected neither the acrosomal integrity, nor the functional integrity of the goat spermatozoa membrane, cooled at 5 °C for up to 72 hours.

Keywords: sperm evaluation; sperm cell, seminal centrifugation

Efeito da renovação de diluente em diferentes temperaturas sobre os parâmetros físicos e pH do sêmen refrigerado de caprinos

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Lucas Oliveira Pinheiro¹, Poliana Almeida Bezerra¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

A refrigeração proporciona à célula espermática de caprinos 48 horas de armazenamento, entretanto esse processo leva ao acúmulo de metabólitos tóxicos que afetam negativamente a viabilidade seminal. A renovação de diluente é uma alternativa para prolongar a viabilidade espermática em diferentes espécies, por possibilitar a substituição de subprodutos tóxicos do metabolismo espermático por uma nova fonte de nutrientes à célula espermática. O uso da centrífuga refrigerada limita a execução da técnica. Diante da ausência de estudos avaliando a substituição da centrífuga refrigerada pela centrífuga de bancada à temperatura ambiente (20°C) no processo de renovação seminal para espécie caprina, o objetivo com este estudo foi avaliar o efeito da renovação de diluente em diferentes temperaturas sobre os parâmetros físicos e pH do sêmen refrigerado de caprinos. O projeto foi realizado no setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia. O período experimental compreendeu maio a junho de 2022. Foram utilizados cinco bodes mestiços adultos, com escore de condição corporal 3,0±0,5, mantidos em sistema extensivo de criação em pastagem formada por *Brachiaria decumbens*, com fornecimento de água à vontade. As coletas seminais foram realizadas uma vez por semana, durante cinco semanas consecutivas, por meio de vagina artificial, utilizando uma fêmea estrogenizada como manequim. Imediatamente após a coleta, foram realizadas as análises das características físicas seminais: volume, aspecto, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva e vigor espermático. As amostras dentro do padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, para sêmen fresco, foram agrupadas em um *pool*. Após formação do *pool*, as características físicas do sêmen foram reavaliadas e o *pool* fracionado aleatoriamente em três tratamentos (T) (n=5): T1 - controle, sêmen resfriado sem renovação de diluente; T2 - sêmen resfriado com renovação de diluente mediante centrifugação à 800G por 10 minutos, utilizando centrífuga refrigerada (MPW Med. Instruments, Varsóvia, Polônia) à 5°C; e T3 - sêmen resfriado com renovação de diluente mediante centrifugação à 800G por 10 minutos, utilizando centrífuga de bancada (Fanem, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente (20 °C). Após fracionamento, foi feita a diluição com diluente citrato-gema de forma a obter 150 milhões de espermatozoides por dose de 0,25 mL. Após a diluição, as amostras foram colocadas em Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brasil) com curva de resfriamento para 5 °C. Às 24, 48 e 72h da entrada das amostras no Botuflex, foram retiradas alíquotas de 100µL de cada tratamento para análise física (motilidade espermática progressiva e vigor espermático) e pH do meio seminal. Após a retirada das alíquotas, as amostras dos tratamentos com renovação de diluente foram submetidas à centrifugação, de acordo com o tratamento, o sobrenadante descartado e o *pellet* de espermatozoide ressuspenso com novo diluente resfriado à 5 °C. Todas as amostras eram armazenadas novamente no Botuflex, no qual os gelos eram substituídos à cada processamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Às variáveis que apresentaram distribuição normal, foi aplicado a ANOVA e o Teste Tukey. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste Kruskal Wallis ajustado. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as avaliações. As amostras seminais entraram para a refrigeração com motilidade progressiva de 90,00±2,50% e vigor espermático 4,2±0,44. Para motilidade espermática progressiva nas horas 24 e 48 não houve diferença entre os tratamentos (P>0,05), entretanto na hora 72, o T2 apresentou motilidade de 79,00±6,51%, diferindo do T1, que apresentou motilidade de 62,00±15,24%. O T3, por sua vez, apresentou motilidade de 78,00±5,70, não diferindo de T1 e T2. Quanto ao vigor espermático, os tratamentos apresentaram diferença na hora 72 (P<0,05), quando T1, T2 e T3 apresentaram, respectivamente, vigor espermático de 2,50±1,00; 3,00±0,50; 3,00±0,25. Observou-se efeito benéfico para renovação à 5°C, quando comparado ao tratamento controle. O T3 não diferiu dos demais tratamentos. Os tratamentos não apresentaram diferença entre si com relação a variável pH (P>0,05). Após 72 horas de resfriamento em T1, T2 e T3 o pH manteve-se próximo a faixa ideal para os espermatozoides: 6,25±0,50, 6,89±0,83 e 7,02±0,92, respectivamente. A renovação de diluente em sêmen refrigerado de caprinos se mostrou benéfica sobre a motilidade espermática progressiva e vigor espermático com 72 horas de resfriamento e não afetou a variável pH, se mostrando uma alternativa viável quando se deseja utilizar o sêmen após 48 horas de refrigeração. Observa-se também que a alteração na temperatura durante a centrifugação não interferiu negativamente as variáveis avaliadas, validando o uso da centrífuga de bancada para renovação de sêmen de bode.

Palavras-chaves: análise seminal, espermatozoides, qualidade espermática

Effect of extender renewal at different temperatures on the physical parameters and pH of refrigerated goat semen

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Lucas Oliveira Pinheiro¹, Poliana Almeida Bezerra¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

Cooling provides goat sperm cells with 48 hours of storage, however this process leads to the accumulation of toxic metabolites that negatively affect seminal viability. Extender renewal is an alternative to prolong sperm viability in different species, as it allows the replacement of toxic by-products of sperm metabolism by a new source of nutrients for the sperm cell. The use of a refrigerated centrifuge limits the execution of the technique. In view of the lack of studies evaluating the replacement of the refrigerated centrifuge by the bench centrifuge at room temperature (20°C) in the seminal renewal process for goat species, this study aimed to evaluate the effect of diluent renewal at different temperatures on the Physical parameters and pH of chilled goat semen. The project was carried out in the goat sector of the Federal University of the Recôncavo of Bahia located in the municipality of Cruz das Almas, Bahia. The experimental period comprised May to June 2022. Five adult crossbred goats were used, with a body condition score of 3±0.5, kept in an extensive rearing system on pasture formed by *Brachiaria decumbens*, with *ad libitum* supply of water. Seminal collections were performed once a week, for five consecutive weeks, through an artificial vagina, using an estrogenized female as a dummy. Immediately after collection, analyzes of seminal physical characteristics were performed: volume, aspect, spermatic turbulence, progressive spermatic motility and spermatic vigor. Samples within the standard established by the Brazilian College of Animal Reproduction, for fresh semen, were grouped into a pool. After pool formation, semen physical characteristics were reassessed and the pool was randomly fractionated into three treatments (T) (n=5): T1 - control, cooled semen without diluent renewal; T2 – cooled semen with diluent renewal by centrifugation at 800G for 10 minutes using a refrigerated centrifuge (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) at 5°C and T3 – cooled semen with diluent renewal by centrifugation at 800G for 10 minutes using benchtop centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) at room temperature (20 °C). After fractionation, dilution was performed with citrate-yolk diluent in order to obtain 150 million spermatozoa per dose of 0.25 mL. After dilution, the samples were placed in Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brazil) with a cooling curve to 5 °C. With 24, 48 and 72h of the entry of the samples in the Botuflex, 100µL aliquots of each treatment were removed for physical analysis (progressive sperm motility and sperm vigor) and pH of the seminal medium. After removing the aliquots, the samples from the treatments with diluent renewal were subjected to centrifugation, according to the treatment, the supernatant discarded and the sperm pellet resuspended with a new diluent cooled at 5 °C. All samples were stored again in Botuflex, whose ices were replaced in each processing. The data was evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. For the variables that presented normal distribution, ANOVA and the Tukey Test were applied. For non-parametric variables, the adjusted Kruskal Wallis test was performed. A significance level of 5% was adopted for all assessments. The seminal samples entered the cooling process with progressive motility of 90.00±2.50% and sperm vigor of 4.2±0.44. For progressive sperm motility at hours 24 and 48 there was no difference among treatments (P>0.05), however at hour 72, T2 showed motility of 79.00±6.51% differing from T1 which showed motility of 62.00±15.24%. T3, in turn, presented motility of 78.00±5.70, not differing from T1 and T2. As for sperm vigor, the treatments showed differences at hour 72 (P<0.05), where T1, T2 and T3 showed the following values, respectively: 2.50±1.00; 3.00±0.50; 3.00±0.25. A beneficial effect was observed for renewal at 5°C, when compared to the control treatment. T3 did not differ from the other treatments. The treatments showed no difference among themselves regarding the pH variable (P>0.05). After 72 hours of cooling at T1, T2 and T3, the pH remained close to the ideal range for spermatozoa: 6.25±0.50, 6.89±0.83 and 7.02±0.92, respectively. Extender renewal in cooled goat semen was beneficial for progressive sperm motility and sperm vigor after 72 hours of cooling and did not affect the pH variable, proving to be a viable alternative when you want to use the semen after 48 hours of cooling. It is also observed that the change in temperature during centrifugation did not negatively interfere with the evaluated variables, validating the use of a bench centrifuge for renewing goat semen.

Keywords: seminal analysis, spermatozoa, sperm quality

Efeito do uso de antioxidantes sobre acrossoma e integridade funcional da membrana em sêmen de caprinos refrigerado submetido à renovação de diluente

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Lorena Ribeiro Silva Andrade¹, Israel Paiva Linhares¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

*E-mail: larissa@ufrb.edu.br

O resfriamento é uma alternativa viável para preservar a viabilidade espermática de caprinos. Porém, o processo de resfriamento resulta em dano espermático, incluindo danos em membranas, que diminui a capacidade espermática de fecundar. Esses danos são resultantes do acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS). Apesar de estarem relacionadas à capacitação espermática, hiperativação, reação acrossomal e fusão espermatozoide-ócito, exercendo papel importante no processo de fecundação, em excesso, as ROS resultam em danos funcionais à célula espermática. Apesar do sistema de defesa antioxidante endógeno, no sêmen processado pode haver um desbalanço entre essa defesa e a produção de ROS, fator determinante na extensão dos danos oxidativos. O estresse oxidativo afeta negativamente a célula espermática, além de aumentar o número de espermatozoides capacitados prematuramente, fazendo com que haja um efeito negativo no desenvolvimento embrionário inicial. As alterações sofridas pela célula espermática durante o processo de resfriamento, que resultam em queda na fertilidade, evidenciam a necessidade de avaliar a adição de componentes como os antioxidantes capazes de eliminar ou neutralizar as ROS e consequentemente reduzir os danos causados à célula espermática. A renovação de diluente é uma técnica promissora, que pode controlar o estresse oxidativo. A ausência de estudos associando o uso de antioxidantes e a renovação de diluente norteia este estudo que tem como objetivo avaliar o efeito do uso de antioxidantes sobre acrossoma e integridade funcional da membrana em sêmen de caprinos refrigerado submetido à renovação de diluente. O projeto foi realizado no setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia localizada no município de Cruz das Almas, no período de julho a setembro de 2022. Foram utilizados sete bodes mestiços adultos, com escore de condição corporal $3,0 \pm 0,5$. As coletas seminais foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas, por meio de vagina artificial, utilizando uma fêmea estroginizada como manequim. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram submetidos à análise dos parâmetros físicos: volume, aspecto, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva e vigor espermático. As amostras que estavam dentro do padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), para sêmen fresco, foram agrupadas em um *pool*. Após formação do *pool*, os parâmetros físicos do sêmen foram reavaliados. Uma vez estando dentro do padrão estabelecido pelo CBRA, o *pool* foi fracionado aleatoriamente em quatro tratamentos (T) (n=8): T1: sêmen refrigerado com renovação de diluente sem acréscimo de antioxidante; T2: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 0,05% de vitamina C (NPS do Brasil Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brasil); T3: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 60 nM/mL^{-1} de vitamina E (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e T4: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 0,05% de vitamina C e 60 nM/mL^{-1} de vitamina E (trolox). Após fracionamento, foi feita a diluição com diluente citrato-gema de forma a obter a concentração de 6×10^6 espermatozoides por mL. Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brasil) com curva de resfriamento para 5°C . Com 24, 48 e 72 horas da entrada das amostras no Botuflex, foram retiradas alíquotas seminais de $100\mu\text{L}$ de cada tratamento para análise da integridade morfológica do acrossoma por meio da coloração de esfregaços seminais com vermelho congo e avaliação da integridade funcional de membrana, utilizando o teste hiposmótico. Após a retirada das alíquotas, as amostras dos tratamentos foram submetidas à centrifugação à $800 \times g$ por 10 minutos utilizando centrífuga de bancada (Fanem, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente (20°C), o sobrenadante descartado e o *pellet* de espermatozoide ressuspenso com novo diluente refrigerado à 5°C , conforme tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Às variáveis que apresentaram distribuição normal, foi aplicado a ANOVA e o Teste Tukey. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste Kruskal Wallis ajustado. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as avaliações. Quanto à integridade da membrana plasmática, não foi observada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), nas horas avaliadas. Após 72 horas de resfriamento, os tratamentos apresentavam os seguintes percentuais de espermatozoides com membrana funcionalmente íntegra: T1: $80,62 \pm 3,77\%$; T2: $83,31 \pm 4,21\%$; T3: $84,56 \pm 3,31\%$; T4: $80,94 \pm 10,42\%$. Na avaliação da integridade morfológica do acrossoma também não houve diferença nas horas 24, 48 e 72 ($P > 0,05$). Com 72 horas de resfriamento foram observados os seguintes percentuais de espermatozoides com acrossoma íntegro: T1: $86,50 \pm 4,22\%$; T2: $88,50 \pm 3,24\%$; T3: $90,18 \pm 3,52\%$; T4: $89,68 \pm 3,51\%$. Observou-se que a adição dos antioxidantes vitamina C e vitamina E (trolox), isoladas ou associadas em diluente para renovação diária não afetou a integridade morfológica do acrossoma e integridade funcional de membrana de espermatozoides de bode, refrigerados à 5°C por 72h.

Palavras-chaves: vitamina C, trolox, análise seminal

Effect of the use of antioxidants on acrosome and membrane functional integrity in refrigerated goat semen submitted to diluent renewal

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Lorena Ribeiro Silva Andrade¹, Israel Paiva Linhares¹, Jamile dos Santos Nardi Gomes¹, Rosileia Silva Souza¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*E-mail: larissa@ufrb.edu.br

Cooling is a viable alternative to preserve sperm viability in goats. However, the cooling process results in sperm damage, including membrane damage, which decreases the ability of the sperm to fertilize. This damage results from the accumulation of reactive oxygen species (ROS). Despite being related to sperm capacitation, hyperactivation, acrosomal reaction and sperm-oocyte fusion, playing an important role in the fertilization process, in excess, ROS result in functional damage to the sperm cell. Despite the endogenous antioxidant defense system, in processed semen there may be an imbalance between this defense and ROS production, a determining factor in the extent of oxidative damage. Oxidative stress negatively affects the sperm cell, in addition to increasing the number of prematurely capacitated spermatozoa, causing a negative effect on early embryonic development. The alterations suffered by the sperm cell during the cooling process, which result in a drop in fertility, highlight the need to evaluate the addition of components such as antioxidants capable of eliminating or neutralizing ROS and consequently reducing the damage caused to the sperm cell. Diluent renewal is a promising technique that can control oxidative stress. The lack of studies associating the use of antioxidants and diluent renewal guides this study, which aims to evaluate the effect of the use of antioxidants on the acrosome and functional integrity of the membrane in cooled goat semen submitted to diluent renewal. The project was carried out in the goat sector of the Federal University of the Recôncavo of Bahia located in the municipality of Cruz das Almas, Bahia, during the period of July to September 2022. Seven adult crossbred goats were used, with a body condition score of 3.0 ± 0.5 . Seminal collections were performed once a week, for eight consecutive weeks, through an artificial vagina, using an estrogenized female as a dummy. Immediately after collection, analyzes of seminal physical parameters were performed: volume, aspect, spermatic turbulence, progressive spermatic motility and spermatic vigor. Samples that were within the standard established by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA) for fresh semen were grouped into a pool. After pool formation, semen physical parameters were reassessed. Once they were within the standard established by the CBRA, the pool was randomly divided into four treatments (T) (n=8): T1: cooled semen with diluent renewal without antioxidant addition; T2: cooled semen with daily renewal of diluent plus 0.05% vitamin C (NPS do Brasil Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brazil); T3: cooled semen with daily renewal of diluent, plus 60 nM/mL⁻¹ of vitamin E (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and T4: cooled semen with daily renewal of diluent, plus 0.05% vitamin C and 60 nM/mL⁻¹ vitamin E (trolox). After fractionation, dilution was performed with citrate-yolk diluent in order to obtain 6×10^6 spermatozoa per mL. After dilution, the samples were placed in Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brazil) with a cooling curve to 5 °C. After 24, 48 and 72 hours after the samples entered the Botuflex, seminal aliquots of 100µL of each treatment were taken for analysis of acrosomal integrity by staining seminal smears with congo red and evaluating the functional integrity of the membrane, using the hyposmotic test. After removing the aliquots, the samples from the treatments were subjected to centrifugation at 800xg for 10 minutes using a benchtop centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) at room temperature (20 °C), the supernatant discarded and the sperm pellet resuspended with new diluent cooled to 5 °C, according to treatment. The data was evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. For the variables that presented normal distribution, ANOVA and the Tukey Test were applied. For non-parametric variables, the adjusted Kruskal Wallis test was performed. A significance level of 5% was adopted for all assessments. As for the integrity of the plasmatic membrane, no difference was observed among the treatments ($P > 0.05$), in the evaluated hours. After 72 hours of cooling, the treatments presented the following percentages of spermatozoa with a functionally intact membrane: T1: $80.62 \pm 3.77\%$; T2: $83.31 \pm 4.21\%$; T3: $84.56 \pm 3.31\%$; T4: $80.94 \pm 10.42\%$. There was also no difference in the assessment of acrosomal integrity at hours 24, 48 and 72 ($P > 0.05$). After 72 hours of cooling, the following percentages of spermatozoa with intact acrosome were observed: T1: $86.50 \pm 4.22\%$; T2: $88.50 \pm 3.24\%$; T3: 90.18 ± 3.52 ; T4: $89.68 \pm 3.51\%$. It was observed that the addition of antioxidants vitamin C and vitamin E (trolox), alone or associated in a diluent for daily renewal, did not affect the acrosomal integrity and functional integrity of the membrane of goat sperm, cooled at 5 °C for 72 hours.

Keywords: vitamin C, trolox, seminal analysis

Efeito do uso de antioxidantes sobre cromatina e atividade mitocondrial em sêmen de caprinos refrigerado submetido à renovação de diluente

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Andreia Souza Lopes¹, Israel Paiva Linhares¹, Rosileia Silva Souza¹, Alexandre Moraes Pinheiro¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

O processo de resfriamento seminal resulta em danos espermáticos em membranas acrossomal, mitocondrial e nucleares e diminui a capacidade fecundante dos espermatozoides devido ao estresse oxidativo, resultante do acúmulo de ROS, que afeta negativamente a motilidade espermática e a integridade do DNA, além de aumentar o número de espermatozoides capacitados prematuramente. Essas alterações sofridas pela célula espermática evidenciam a necessidade de avaliar a adição de antioxidantes capazes de eliminar ou neutralizar as ROS. A renovação de diluente é uma estratégia promissora na eliminação de ROS. A ausência de estudos associando o uso de antioxidantes e a renovação de diluente norteia este estudo que tem como objetivo avaliar o efeito do uso de antioxidantes sobre cromatina e atividade mitocondrial em sêmen de caprinos refrigerado submetido à renovação de diluente. O projeto foi realizado no setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizada no município de Cruz das Almas, entre os meses de julho a setembro de 2022. Foram utilizados sete bodes mestiços adultos, com escore de condição corporal $3,0 \pm 0,5$ (escala 1 a 5). As coletas seminais foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas, por meio de vagina artificial. Imediatamente após a coleta, foram analisados os seguintes parâmetros: volume, aspecto, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva e vigor espermático. As amostras que estavam dentro do padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), para sêmen fresco, foram agrupadas em um *pool*. Após formação do *pool*, este era reavaliado e fracionado aleatoriamente em quatro tratamentos (T) (n=8): T1: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente sem acréscimo de antioxidante; T2: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 0,05% de vitamina C (NPS do Brasil Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brasil); T3: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 60 nM/mL⁻¹ de vitamina E (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e T4: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 0,05% de vitamina C e 60 nM/mL⁻¹ de vitamina E (trolox). Após fracionamento, foi feita a diluição com diluente citrato-gema de forma a obter 150 milhões de espermatozoides por dose de 0,25 mL. Após a diluição, as amostras foram colocadas em Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brasil) com curva de resfriamento para 5°C. Com 24, 48 e 72 horas da entrada das amostras no Botuflex, foram retiradas alíquotas seminais de cada tratamento para análise da atividade mitocondrial utilizando o corante 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com 1 mg/mL de fosfato salino tamponado (PBS), e análise de cromatina utilizando solução de Carnoy's e azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0. As amostras dos tratamentos foram submetidas à centrifugação à 800xg por 10 minutos utilizando centrífuga de bancada (Fanem, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente (20°C), sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* de espermatozoide ressuspensão com novo diluente refrigerado à 5°C, conforme tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Às variáveis que apresentaram distribuição normal, foi aplicado a ANOVA e o Teste Tukey. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste Kruskal Wallis ajustado. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as avaliações. Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) para a atividade mitocondrial na hora 24. Na hora 48, T1 e T4 não apresentaram espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial ($0,00 \pm 0,00\%$; $0,00 \pm 0,38\%$, respectivamente), enquanto T2 e T3, apresentaram espermatozoides com ausência de atividade mitocondrial, porém, o percentual foi mínimo: $0,75 \pm 5,00$ e $0,75 \pm 3,38$, respectivamente. Na hora 72, não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), quando obteve-se os seguintes percentuais de espermatozoides com atividade mitocondrial completa e média, respectivamente: T1: $1,93 \pm 1,87\%$ e $74,25 \pm 10,11\%$; T2: $2,56 \pm 1,74\%$ e $78,25 \pm 17,76\%$; T3: $2,56 \pm 5,46\%$ e $87,75 \pm 9,20\%$; T4: $3,75 \pm 4,78\%$ e $70,31 \pm 15,68\%$. Quanto a compactação da cromatina, houve diferença na hora 24, no percentual de espermatozoides com cromatina íntegra e fragmentada ($P < 0,05$). O percentual de espermatozoides com cromatina íntegra na hora 24, foi maior em T4 ($99,60 \pm 0,41\%$) e menor em T1 ($98,82 \pm 0,39\%$) ($P < 0,05$), enquanto T2 ($99,25 \pm 0,49\%$) e T3 ($99,35 \pm 0,27\%$) foram semelhantes entre si e aos demais tratamentos ($P > 0,05$). Na hora 48 também houve diferença para o percentual de espermatozoides com cromatina fragmentada ($P < 0,05$). Onde T3 ($0,48 \pm 0,14\%$) e T4 ($0,43 \pm 0,22\%$) apresentaram menores percentuais de espermatozoides com cromatina fragmentada quando comparado à T1 ($1,10 \pm 0,35\%$) e T2 ($0,80 \pm 0,30\%$). Nesse sentido, observa-se que a adição de antioxidantes em sêmen renovado de caprinos foi benéfica para a integridade do DNA espermático com 48 horas de resfriamento. Entretanto, não foi observada diferença entre os grupos para os percentuais de espermatozoides com cromatina íntegra (T1: $99,00 \pm 0,40\%$; T2: $99,50 \pm 0,50\%$; T3: $99,40 \pm 0,55\%$; T4: $99,40 \pm 0,75\%$) e fragmentada (T1: $1,00 \pm 0,40\%$; T2: $0,50 \pm 0,50\%$; T3: $0,60 \pm 0,53\%$; T4: $0,60 \pm 0,75\%$) com 72 horas de resfriamento. Observou-se que, com 72 horas de resfriamento, a adição de antioxidantes ao sêmen de caprinos renovado diariamente não interferiu na atividade mitocondrial e na integridade do DNA espermático.

Palavras-chaves: vitamina C, vitamina E, DNA espermático

Effect of the use of antioxidants on chromatin and mitochondrial activity in refrigerated goat semen submitted to diluent renewal

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Andreia Souza Lopes¹, Israel Paiva Linhares¹, Rosileia Silva Souza¹, Alexandre Moraes Pinheiro¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

The seminal cooling process results in sperm damage to acrosomal, mitochondrial and nuclear membranes and decreases the ability of the sperm to fertilize due to oxidative stress, resulting from the accumulation of ROS, which negatively affects sperm motility and DNA integrity, in addition to increasing the number of prematurely capacitated sperm. These alterations suffered by the sperm cell highlight the need to evaluate the addition of antioxidants capable of eliminating or neutralizing ROS. Diluent renewal is a promising strategy for eliminating ROS. The lack of studies associating the use of antioxidants and diluent renewal guides this study, which aims to evaluate the effect of the use of antioxidants on chromatin and mitochondrial activity in refrigerated goat semen submitted to diluent renewal. The project was carried out in the goat sector of the Federal University of the Recôncavo of Bahia, located in the municipality of Cruz das Almas, Bahia, between the months of July to September 2022. Seven adult crossbred goats were used, with a body condition score of 3.0 ± 0.5 (scale 1 to 5). Seminal collections were performed once a week, for eight consecutive weeks, through an artificial vagina. Immediately after collection, the following parameters were analyzed: volume, aspect, spermatic turbulence, progressive spermatic motility and spermatic vigor. Samples that were within the standard established by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA) for fresh semen were grouped into a pool. After pool formation, it was reassessed and randomly divided into four treatments (T) (n=8): T1: refrigerated semen with daily diluent renewal without adding antioxidant; T2: refrigerated semen with daily diluent renewal plus 0.05% vitamin C (NPS do Brasil Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brazil); T3: refrigerated semen with daily diluent renewal, plus 60 nM/mL⁻¹ of vitamin E (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and T4: refrigerated semen with daily diluent renewal, plus 0.05% vitamin C and 60 nM/mL⁻¹ vitamin E (trolox). After fractionation, dilution was performed with citrate-yolk diluent in order to obtain 150 million spermatozoa per dose of 0.25 mL. After dilution, the samples were placed in Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brazil) with a cooling curve to 5°C. At 24, 48 and 72 hours after the samples entered the Botuflex, seminal aliquots of each treatment were taken for analysis of mitochondrial activity using the dye 3,3'-diaminobenzidine (DAB) with 1 mg/mL of phosphate buffered saline (PBS), and chromatin analysis using Carnoy's solution and 0.025% toluidine blue in McIlvaine buffer, pH 4.0. The treatment samples were subjected to centrifugation at 800xg for 10 minutes using a benchtop centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) at room temperature (20 °C), the supernatant discarded and the sperm pellet resuspended with a new diluent refrigerated at 5°C, according to treatment. The data was evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. For the variables that presented normal distribution, ANOVA and the Tukey Test were applied. For non-parametric variables, the adjusted Kruskal Wallis test was performed. A significance level of 5% was adopted for all assessments. There was no difference among treatments ($P > 0.05$) for mitochondrial activity at hour 24. At hour 48, T1 and T4 did not show percentages of sperm with no mitochondrial activity ($0.00 \pm 0.00\%$; $0.00 \pm 0.38\%$, respectively), while T2 and T3 showed percentages of sperm with no mitochondrial activity, however, the percentage was minimal: 0.75 ± 5.00 and 0.75 ± 3.38 , respectively. At hour 72, there was no difference among treatments ($P > 0.05$), when the following percentages of spermatozoa with complete and average mitochondrial activity were observed, respectively: T1: $1.93 \pm 1.87\%$ and $74.25 \pm 10.11\%$; T2: $2.56 \pm 1.74\%$ and $78.25 \pm 17.76\%$; T3: $2.56 \pm 5.46\%$ and $87.75 \pm 9.20\%$; T4: $3.75 \pm 4.78\%$ and $70.31 \pm 15.68\%$. As for chromatin compaction, there was a difference at hour 24, in the percentage of spermatozoa with intact and fragmented chromatin ($P < 0.05$). The percentage of spermatozoa with intact chromatin at hour 24 was higher in T4 ($99.60 \pm 0.41\%$), and lowest in T1 ($98.82 \pm 0.39\%$) ($P < 0.05$), while T2 ($99.25 \pm 0.49\%$) and T3 ($99.35 \pm 0.27\%$) did not differ from each other or the other treatments ($P > 0.05$). At hour 48 there was also a difference for the percentage of spermatozoa with fragmented chromatin ($P < 0.05$). Where T3 ($0.48 \pm 0.14\%$) and T4 ($0.43 \pm 0.22\%$) had lower percentages of sperm with fragmented chromatin when compared to T1 ($1.10 \pm 0.35\%$) and T2 ($0.80 \pm 0.30\%$). In this sense, it is observed that the addition of antioxidants in renewed goat semen was beneficial for the integrity of sperm DNA after 48 hours of cooling. However, no difference was observed among the groups for the percentage of spermatozoa with intact chromatin (T1: $99.00 \pm 0.40\%$; T2: $99.50 \pm 0.50\%$; T3: $99.40 \pm 0.55\%$; T4: $99.40 \pm 0.75\%$) and fragmented (T1: $1.00 \pm 0.40\%$; T2: $0.50 \pm 0.50\%$; T3: $0.60 \pm 0.53\%$; T4: $0.60 \pm 0.75\%$) with 72 hours of cooling. It was observed that, with 72 hours of cooling, the addition of antioxidants to goat semen renewed daily did not interfere with mitochondrial activity and sperm DNA integrity.

Keywords: vitamin C, vitamin E, sperm DNA

Eficiência de métodos para aferição de temperatura da superfície escrotal durante insulação testicular

G. Rizzoto^{1*}, E.S. Rossi^{1,4}, A.G.R. Pupulim¹, V.M. Codognoto¹, H.D. Mogollon-Garcia, M.B. Teixeira¹, J.C. Carvalho¹, P.Z. Rattes¹, E. Oba, P.H.E. Trindade, J.P. Kastelic², J.C.P. Ferreira¹

¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. ²Departamento de Reprodução, Obstetria e Saúde do Rebanho, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Ghent, Ghent, WF, Bélgica. ³Departamento de Saúde Animal de Produção, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Calgary, Calgary, AB, Canadá. ⁴Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, Garça-SP

*e-mail: g.rizzoto@unesp.br

As recentes mudanças climáticas requerem atenção, posto que o estresse térmico (ET) é nocivo para produção e reprodução dos ruminantes, nos quais a temperatura testicular necessita estar entre 3 e 5 °C abaixo da corporal. Recentes estudos foram desenvolvidos nos quais o aumento da temperatura testicular, promovido de forma artificial através de insulação escrotal, permitiram a identificação de mecanismos relacionados ao processo patofisiológico desencadeado pelo ET testicular. Um dos desafios para comprovação e refinamento dessa técnica experimental é a necessidade de se aferir a temperatura escrotal de forma precisa, de modo a caracterizar as diferenças pré- e pós-insulação. O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes ferramentas de mensuração da temperatura escrotal durante o processo de insulação. Quinze carneiros mestiços adultos foram submetidos à insulação escrotal por 48 h, com o emprego de fraldas infantis descartáveis cobrindo toda a superfície escrotal. Todos os animais apresentaram temperaturas retais fisiológicas pré- e pós-insulação (~38,5°C). Duas ferramentas foram empregadas para a mensuração da temperatura da superfície escrotal: 1) câmera termográfica (Flir E53, MSX[®], Termovisor Brazil[®], Atibaia-SP, Brasil), tendo sido realizadas imagens dos escrotos pré- e imediatamente pós-remoção da insulação e 2) sistema de datalogger (HOBO[®], Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA), colocado entre a superfície escrotal e o material isolante. O datalogger permitiu o registro das temperaturas durante todo o período experimental. Os termogramas escrotais evidenciaram que a temperatura média da superfície escrotal pré-insulação foi de 30,84 ± 0,27, enquanto a pós-insulação foi de 35,84 ± 0,03 °C (P < 0.0001). Por outro lado, o sistema de datalogger evidenciou que a temperatura média da superfície escrotal, ao longo do período de insulação foi de 35,64 ± 0,62 °C (P < 0.0001); não foram observadas diferenças entre os dois métodos de avaliação (P>0.05). Em conclusão, ambas as ferramentas são eficientes para mensuração da temperatura da superfície escrotal em modelos de experimentais de indução de ET testicular que utilizam a insulação testicular.

Palavras chave: Estresse-térmico; temperatura testicular; termografia.

Method efficiency to access scrotal surface temperature during testicular insulation

G. Rizzoto^{1*}, E.S. Rossi^{1,4}, A.G.R. Pupulim¹, V.M. Codognoto¹, H.D. Mogollon-Garcia, M.B. Teixeira¹, J.C. Carvalho¹, P.Z. Rattes¹, E. Oba, P.H.E. Trindade, J.P. Kastelic³, J.C.P. Ferreira¹

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. ²Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Ghent, WF, Belgium. ³Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canada. ⁴Faculty of Higher Education and Comprehensive Training – FAEF, Garça-SP
*e-mail: g.rizzoto@unesp.br

Recent climatic changes raise awareness to ruminant production and reproduction, since heat stress (HS) has a negative impact since the testicular temperature is required to be 3-5°C below body core temperature. Novel studies were developed through an artificial increase of testicular temperature, which allowed the study of the testicular pathophysiological process triggered post-HS exposure. However, a challenge for confirming HS and to refine the technique is the capability of having reliable testicular temperature measurement during the insulation process. A total of fifteen mix-bred rams were subjected to testicular insulation for 48 h, through the placement of disposal diapers covering the whole testicular surface. All animals presented normal rectal temperature pre- and post-insulation (~38.5°C). Two methods were used to access scrotal surface temperature: 1) thermographic camera (Flir E53, MSX[®], Termovisor Brazil[®], Atibaia-SP, Brazil) with scrotal images taken pre- and immediately after removal of insulation and 2) a datalogger system (HOBO[®], Onset Computer Corporation, Bourne, MA, USA), placed between scrotal surface and the insulating material. The datalogger allowed recordings of temperature throughout the experimental period. The scrotal thermograms indicated that the average scrotal surface temperature pre-insulation was of 30.84 ± 0.27 , whereas, post-insulation the temperature reached $35.84 \pm 0.03^\circ\text{C}$ ($P < 0.0001$). In addition, the datalogger system recorded a plateau temperature of $35.64 \pm 0.62^\circ\text{C}$ ($P < 0.0001$) during the insulation period; no difference between the temperature assessment methods was observed ($P > 0.05$). In conclusion, both tools were efficient to assess scrotal surface temperature in experimental models related to induction of testicular heat stress via testicular insulation.

Key words: Heat stress; testicular temperature; thermography.

Estudo comparativo das características seminais a fresco e pós-descongelamento entre um clone de carneiro Santa Inês e seu original

Lúcia Cristina Pereira Arruda¹, Gustavo de Oliveira Alves Pinto¹, Maria Madalena Pessoa Guerra¹,
Gustavo Ferrer Carneiro^{1*}

¹ANDROLAB/UFRPE, Recife, PE, Brasil

*e-mail: gustavo.ferrer@ufrpe.br

Clones ou cópias idênticas de indivíduos podem ser produzidos graças à evolução da biotécnica de transferência nuclear por células somáticas (TNCS) ou reconstrução embrionária. A clonagem animal representa um dos maiores avanços obtidos na biotecnologia. A técnica de transferência nuclear tem diversas aplicações em diferentes setores estratégicos, sejam científicos ou produtivos. Com isso, o objetivo desse estudo foi realizar uma avaliação das características seminais de um carneiro clonado (C) da raça Santa Inês, com 1 ano e 2 meses de idade, derivado de transferência nuclear de células somáticas, comparado ao seu original (O), com 3 anos de idade, e avaliar possíveis diferenças entre eles. Para tanto, foram colhidos 17 ejaculados, de cada um dos animais, através do método de vagina artificial, usando uma fêmea em estro como manequim. No momento da colheita, as amostras foram avaliadas quanto ao turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas (Botuvital[®]), de forma subjetiva, em microscópio óptico. Após avaliação e aprovação, as amostras foram diluídas em Botubov[®] para concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL, envasada em palhetas de 0,25 mL e submetidas ao processo de congelamento, utilizando sistema automatizado (TK3000[®], TK Tecnologia em Congelamento Ltda) e por fim foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até a avaliação. No momento das análises, as amostras de sêmen (2 palhetas) de cada partida, foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e processadas para avaliação da cinética espermática (CASA) e integridade de membrana plasmática (Diacetato de carboxifluoresceína + Iodeto de Propídio - Microscopia de Epifluorescência). Os dados não foram submetidos a análise estatística e são apresentados como média \pm desvio padrão. Pode-se observar que para os parâmetros de sêmen fresco como turbilhonamento (O: $3,5 \pm 0,51$ / C: $4,06 \pm 0,63$), motilidade total (O: $78,24 \pm 6,11$ / C: $82,94 \pm 8,11\%$), vigor (O: $3,82 \pm 0,39$ / C: $4,18 \pm 0,88$) e concentração espermática (O: $2,85 \times 10^9 \pm 1,63$ / C: $3,08 \times 10^9 \pm 1,07$ spz/mL) as médias do clone foram superiores à do original. O mesmo foi observado para parâmetros de sêmen congelado como motilidade total (O: $61,62 \pm 5,91$ / C: $77,04 \pm 6,80\%$), motilidade progressiva (O: $45,95 \pm 7,92$ / C: $52,12 \pm 7,14\%$), amplitude de deslocamento lateral – ALH (O: $1,55 \pm 0,13$ / C: $1,95 \pm 0,31$ μm), frequência de batimento cruzado - BCF (O: $7,60 \pm 0,43$ / C: $8,78 \pm 0,80$ Hz) e integridade de membrana plasmática (O: $55,88 \pm 9,05$ / C: $79,59 \pm 7,95\%$). Já para velocidade curvilínea – VCL (O: $101,85 \pm 13,12$ / C: $101,67 \pm 8,51$ $\mu\text{m/s}$) não houve diferença entre as médias. Entretanto, para velocidade em linha reta – VSL (O: $89,32 \pm 14,71$ / C: $77,79 \pm 10,66$ $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória – VAP (O: $96,48 \pm 14,25$ / C: $89,21 \pm 9,23$ $\mu\text{m/s}$), linearidade – LIN (O: $87,34 \pm 3,91$ / C: $76,39 \pm 6,85\%$), retilinearidade - STR (O: $92,36 \pm 2,04$ / C: $86,95 \pm 3,68\%$) e wobble – WOB (O: $94,51 \pm 2,33$ / C: $87,74 \pm 4,61\%$) o sêmen do animal original apresentou maiores médias que o clone. Com estes resultados preliminares, pode-se concluir que não houve efeitos deletérios na espermatogênese nem na fisiologia e qualidade seminal do carneiro clone em relação ao seu original, seja no sêmen fresco ou pós-descongelamento, apesar da diferença de idade entre os animais. No entanto, faz-se necessário em trabalhos futuros realizar teste de fertilidade com o sêmen criopreservado do clone, que já possui filhos nascidos vivos e saudáveis através de monta natural, para atestar a qualidade do sêmen após o congelamento-descongelamento.

Palavras Chaves: ovino, transferência nuclear, sêmen, criopreservação.

Comparative study of fresh and post-thawing seminal characteristics between a Santa Inês ram clone and its original

Lúcia Cristina Pereira Arruda¹, Gustavo de Oliveira Alves Pinto¹, Maria Madalena Pessoa Guerra¹,
Gustavo Ferrer Carneiro^{1*}

¹ANDROLAB/UFRPE, Recife, PE, Brasil

*e-mail: gustavo.ferrer@ufrpe.br

Clones or identical copies of individuals can be produced thanks to the evolution of the biotechnique of somatic cell nuclear transfer (SCNT) or embryonic reconstruction. Animal cloning represents one of the greatest advances in biotechnology. The nuclear transfer technique has several applications in different strategic sectors, whether scientific or productive. Therefore, the aim of this study was to evaluate the seminal characteristics of a cloned ram (C) of the Santa Inês breed, aged 1 year and 2 months, derived from somatic cell nuclear transfer, compared to its original (O), with 3 years old, and evaluate possible differences between them. For this purpose, 17 ejaculates were collected from each animal, using artificial vagina method, with a female in estrus as a dummy. At the time of collection, the samples were subjectively evaluated for wave motion, motility, vigor, concentration and sperm pathology (Botuvital®), in an optical microscope. After evaluation and approval, samples were diluted in Botubov® for a final concentration of 200×10^6 spermatozoa/mL, packaged in 0.25 mL straws and subjected to freezing process, using an automated system (TK3000®, TK Tecnologia em Congelamento Ltda.) and finally, they were stored in liquid nitrogen (-196 °C) until evaluation. At the time of analysis, semen samples (2 straws) from each batch were thawed in a water bath at 37 °C for 30 seconds and processed for evaluation of sperm kinetics (CASA) and plasma membrane integrity (Carboxyfluorescein diacetate + Propidium Iodide - Epifluorescence Microscopy). Data were not subjected to statistical analysis and are presented as mean \pm standard deviation. It can be seen that for fresh semen parameters such as wave motion (O: 3.5 ± 0.51 / C: 4.06 ± 0.63), total motility (O: 78.24 ± 6.11 / C: $82.94 \pm 8.11\%$), vigor (O: 3.82 ± 0.39 / C: 4.18 ± 0.88) and sperm concentration (O: $2.85 \times 10^9 \pm 1.63$ / C: $3.08 \times 10^9 \pm 1.07$ spz/mL) the means of the clone were higher than the original. The same was observed for frozen semen parameters such as total motility (O: 61.62 ± 5.91 / C: $77.04 \pm 6.80\%$), progressive motility (O: 45.95 ± 7.92 / C: $52.12 \pm 7.14\%$), amplitude of lateral displacement - ALH (O: 1.55 ± 0.13 / C: 1.95 ± 0.31 μm) and beat crossed flagellar - BCF (O: 7.60 ± 0.43 / C: 8.78 ± 0.80 Hz) and plasma membrane integrity (O: 55.88 ± 9.05 / C: $79.59 \pm 7.95\%$). As for curved velocity - VCL (O: 101.85 ± 13.12 / C: 101.67 ± 8.51 $\mu\text{m}/\text{sec}$) there was no difference between the means. However, for straight line velocity - VSL (O: 89.32 ± 14.71 / C: 77.79 ± 10.66 $\mu\text{m}/\text{sec}$), average trajectory velocity - VAP (O: 96.48 ± 14.25 / C: 89.21 ± 9.23 $\mu\text{m}/\text{sec}$), linearity - LIN (O: 87.34 ± 3.91 / C: $76.39 \pm 6.85\%$), straightness - STR (O: 92.36 ± 2.04 / C: $86.95 \pm 3.68\%$) and wobble - WOB (O: 94.51 ± 2.33 / C: $87.74 \pm 4.61\%$) the semen of the original animal showed higher averages than the clone. With these preliminary results, it can be concluded that there were no deleterious effects on spermatogenesis nor the physiology and seminal quality of the cloned ram in relation to its original, whether in fresh or post-thawing semen, despite the age difference between the animals. However, it is necessary in future works to carry out a fertility test with the cryopreserved semen of the clone, which already has lambs born alive and healthy through natural mating, to attest to the quality of the semen after freezing-thawing.

Keywords: sheep, nuclear transfer, semen, cryopreservation.

Renovação de diluente associado ao uso de antioxidantes sobre parâmetros físicos, pH e vitalidade em sêmen refrigerado de caprinos

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Lucas Oliveira Pinheiro¹, Andreia Souza Lopes¹, Rosileia Silva Souza¹, Poliana Almeida Bezerra¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

O processo de resfriamento resulta em danos espermáticos oriundos do acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ROS), que pode comprometer o potencial de fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. As ROS estão diretamente relacionadas à processos fisiológicos essenciais à fecundação, entretanto, em excesso provocam danos funcionais à célula espermática. Apesar do plasma seminal apresentar defesas antioxidantes, no sêmen processado pode haver um desbalanço entre essas defesas e a produção de ROS, fator determinante na extensão dos danos oxidativos. As alterações sofridas pela célula espermática durante o processo de redução da temperatura, evidenciam a necessidade de avaliar a adição de antioxidantes ao meio, capazes de eliminar ou neutralizar as ROS. Quando se fala em eliminar ROS, a renovação de diluente pode ser citada como uma estratégia promissora. Neste contexto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da renovação de diluente associada ao uso de antioxidantes sobre os parâmetros físicos, pH e vitalidade em sêmen refrigerado de caprinos. O projeto foi realizado no setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizado no município de Cruz das Almas, Bahia. O período experimental foi de julho a setembro de 2022. Foram utilizados sete bodes mestiços adultos, com escore de condição corporal média de 3,0±0,5. As coletas seminais foram realizadas uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas, por meio de vagina artificial. Imediatamente após a coleta, foram realizadas as análises dos parâmetros físicos seminais: volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade progressiva e vigor espermático. As amostras que estavam dentro do padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), para sêmen fresco, foram agrupadas em um *pool*. Após formação do *pool*, este foi reavaliado e fracionado aleatoriamente em quatro tratamentos (T) (n=8): T1: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente sem acréscimo de antioxidante; T2: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 0,05% (v/v) de vitamina C (NPS do Brasil Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brasil); T3: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 60 nM/mL⁻¹ de vitamina E (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA); e T4: sêmen refrigerado com renovação diária de diluente, acrescido de 0,05% de vitamina C e 60 nM/mL⁻¹ de vitamina E (Trolox). Após fracionamento foi feita a diluição com diluente citrato-gema de forma a obter 150 milhões de espermatozoides por dose de 0,25 mL. Após a diluição, as amostras foram colocadas em Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brasil) com curva de resfriamento para 5°C. Com 24, 48 e 72 horas da entrada das amostras no Botuflex, foram retiradas alíquotas seminais de cada tratamento para análise física (motilidade espermática progressiva e vigor espermático), vitalidade (eosina-nigrosina) e pH. Após a retirada das alíquotas, as amostras dos tratamentos com renovação de diluente foram submetidas à centrifugação à 800 xg por 10 min à temperatura ambiente (20 °C), o sobrenadante descartado e o *pellet* de espermatozoide ressuspensão com novo diluente resfriado à 5 °C, conforme tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para variáveis com distribuição normal foi aplicado o teste de médias ANOVA e o Teste Tukey com nível de significância de 5%. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste Kruskal Wallis ajustado. As amostras seminais iniciaram o resfriamento com motilidade espermática progressiva de 88,75±3,53% e vigor espermático 3,75±0,50. A motilidade espermática progressiva após 24 e 48 e 72 h, não apresentou diferença entre os tratamentos (P>0,05). Após 72 horas de resfriamento, os tratamentos apresentaram os seguintes valores para motilidade: 72,50±8,86% (T1); 73,12±7,03% (T2); 77,50±6,54% (T3) e 75,62±6,23% (T4). Para a vitalidade, após 72 horas de resfriamento, os tratamentos T1, T2, T3 e T4 apresentaram, respectivamente, 87,38±4,32%; 90,94±3,74%; 91,31±3,93%; 92,82±3,64% de espermatozoides vivos, não havendo diferença em nenhum dos períodos avaliados (P>0,05). Quanto ao vigor espermático, após 48h de resfriamento, os tratamentos T2 (3,06±0,17), T3 (3,37±0,35) e T4 (3,18±0,25) foram semelhantes entre si (P>0,05), e superiores ao T1 (2,87±0,35; P<0,005. Após 72 h, também houve diferenças entre os grupos (P<0,05), sendo que o T3 apresentou maior vigor (3,25±0,26) entre os tratamentos T1 (2,43±0,56) e T2 (2,62±0,51), porém semelhante ao tratamento T4 (3,00±0,37), que também não diferiu dos demais grupos. O pH não alterou entre os tratamentos nos diferentes tempos de resfriamento. Com os resultados deste estudo, foi possível observar que a adição de trolox 60 nM mL⁻¹ em sêmen renovado de bodes se mostrou benéfica para o vigor espermático, sendo responsável pela manutenção desse parâmetro dentro do preconizado pelo CBRA até as 72 horas de resfriamento, esse fato pode estar relacionado a diminuição ou neutralização de ROS, proporcionada pela adição desse antioxidante. Quanto à motilidade espermática, vitalidade e pH, não houve influência da adição de trolox e vitamina C isoladas ou em associação em sêmen de bode submetido à renovação diária até 72 horas de resfriamento.

Palavras-chave: vitamina C, vitamina E, sêmen renovado

Diluent renewal associated with the use of antioxidants on physical parameters, pH and vitality in refrigerated goat semen

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Lucas Oliveira Pinheiro¹, Andreia Souza Lopes¹, Rosileia Silva Souza¹, Poliana Almeida Bezerra¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

The cooling process results in sperm damage from the accumulation of reactive oxygen species (ROS), which can compromise the potential of fertilization and initial embryo development. ROS are directly related to physiological processes essential to fertilization. However, excess ROS results in functional damage to the sperm cell. Although seminal plasma has antioxidant defenses, in processed semen there may be an imbalance between these defenses and ROS production, a determining factor in the extent of oxidative damage. The alterations suffered by the sperm cell during the temperature reduction process, highlight the need to evaluate the addition of antioxidants, capable of eliminating or neutralizing ROS. When it comes to eliminating ROS, diluent renewal can be cited as a promising technique. In this context, this study aimed to evaluate the effect of diluent renewal associated with the use of antioxidants on physical parameters, pH and vitality in refrigerated goat semen. The project was carried out in the goat sector of the Federal University of the Recôncavo of Bahia located in the municipality of Cruz das Almas, Bahia. The experimental period comprised July to September 2022. Seven adult crossbred goats were used, with a body condition score of 3.0 ± 0.5 . Seminal collections were performed once a week, for eight consecutive weeks, through an artificial vagina. Immediately after collection, analyzes of seminal physical parameters were performed: volume, aspect, spermatic turbulence, progressive spermatic motility and spermatic vigor. Samples that were within the standard established by the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA) for fresh semen were grouped into a pool. After pool formation, it was reassessed and randomly divided into four treatments (T) (n=8): T1: refrigerated semen with extender renewal without adding antioxidant; T2: refrigerated semen with daily renewal of extender plus 0.05% (v/v) vitamin C (NPS of Brasil Farmacêutica LTDA, São Paulo, Brazil); T3: refrigerated semen with daily renewal of extender, plus 60 nM/mL⁻¹ of vitamin E (Trolox) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and T4: refrigerated semen with daily renewal of diluent, plus 0.05% vitamin C and 60 nM/mL⁻¹ vitamin E (trolox). After fractionation, dilution was performed with citrate-yolk diluent in order to obtain 150 million spermatozoa per dose of 0.25 mL. After dilution, the samples were placed in Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brazil) with a cooling curve to 5 °C. At 24, 48 and 72 hours after the samples entered the Botuflex, seminal aliquots of each treatment were taken for physical analysis (progressive sperm motility and sperm vigor), vitality (eosin-nigrosin) and pH. After removing the aliquots, the samples from the treatments with diluent renewal were subjected to centrifugation at 800 xg for 10 minutes using a benchtop centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) at room temperature (20 °C), the supernatant discarded and the pellet of resuspended spermatozoa with a new diluent refrigerated at 5 °C, according to treatment. The data was evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. For the variables that presented normal distribution, ANOVA and the Tukey Test were applied with a level of significance of 5%. For non-parametric variables, the adjusted Kruskal Wallis test was performed. Seminal samples entered cooling with progressive sperm motility of $88.75 \pm 3.53\%$ and sperm vigor 3.75 ± 0.50 . Progressive sperm motility after 24 and 48 and 72 hours did not differ among treatments ($P > 0.05$). After 72 hours of cooling, the treatments presented the following values for motility: $72.50 \pm 8.86\%$ (T1); $73.12 \pm 7.03\%$ (T2); $77.50 \pm 6.54\%$ (T3); $75.62 \pm 6.23\%$ (T4). As for vitality, after 72 hours of cooling, T1, T2, T3 and T4 presented, respectively: $87.38 \pm 4.32\%$; $90.94 \pm 3.74\%$; $91.31 \pm 3.93\%$; $92.82 \pm 3.64\%$ of live spermatozoa, not showing a difference in the evaluated periods ($P > 0.05$). As for spermatic vigor, after 48 hours of cooling the treatments T2 (3.06 ± 0.17), T3 (3.37 ± 0.35) and T4 (3.18 ± 0.25) were similar to each other ($P > 0.05$), and superior to T1 (2.87 ± 0.35) ($P < 0.05$). After hour 72, there were also differences among groups ($P < 0.05$) T3 showed greater vigor (3.25 ± 0.26) between treatments T1 (2.43 ± 0.56) and T2 (2.62 ± 0.51), however similar to T4 (3.00 ± 0.37), which did not differ from the other groups. The pH did not differ among treatments in the different times of cooling. With the results of this study, it was possible to observe that the addition of trolox 60 nM mL⁻¹ in renewed goat semen is shown to be beneficial for spermatic vigor, being responsible for the maintenance of this parameter within the preconized by CBRA until 72 hours of cooling, this fact may be related to the decrease of neutralization of ROS, provided by the addition of this antioxidant. As to spermatic mobility, vitality and pH, there was no influence of trolox and vitamin C addition isolated or associated in goat semen submitted to daily renewal until 72 hours of cooling.

Keywords: vitamin C, vitamin E, renewed semen

Renovação de diluente em diferentes temperaturas e seu efeito sobre a atividade mitocondrial e integridade de cromatina em sêmen refrigerado de caprinos

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Alana Graziella Ferreira de Jesus Silva¹, Rosileia Silva Souza¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

O uso do sêmen refrigerado de bodes proporciona à célula espermática 48 horas de tempo de armazenamento. Ao longo desse período, ocorrem alterações bioquímicas do meio diluidor que afetam negativamente a viabilidade espermática, como o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam à peroxidação lipídica e consequente declínio da qualidade seminal. Sabe-se que a renovação de diluente é uma alternativa para prolongar a viabilidade espermática, pois além de eliminar os subprodutos tóxicos do metabolismo espermático, é possível fornecer uma nova fonte de nutrientes aos espermatozoides com o acréscimo do novo diluente. A necessidade de centrifugação sob refrigeração dificulta a execução da técnica de renovação a campo. Pensando em viabilizar a técnica a campo e avaliar se o uso da centrifuga de bancada à temperatura ambiente (20°C), em substituição à centrífuga refrigerada, resultaria em danos espermáticos provocados pelo choque térmico, este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da renovação de diluente em diferentes temperaturas sobre a atividade mitocondrial e integridade da cromatina em sêmen refrigerado de caprinos. O projeto foi realizado no setor de Caprinocultura da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia localizada no município de Cruz das Almas, no período de maio a junho de 2022. Foram utilizados cinco bodes mestiços adultos, com escore de condição corporal média de 3,0±0,5, manejados em sistema extensivo de criação, em piquetes com pastagem formada por *Brachiaria decumbens*, com fornecimento de água à vontade. As coletas seminais foram realizadas uma vez por semana, durante cinco semanas consecutivas, por meio de vagina artificial, utilizando uma fêmea estrogenizada como manequim. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram submetidos às análises de volume, aspecto, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva e vigor espermático. Os ejaculados que estavam dentro do padrão estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal foram agrupados em um *pool*. Após formação do *pool*, as características do sêmen foram reavaliadas e o *pool* fracionado em três tratamentos (T) (n=5): T1 - controle, sêmen refrigerado sem renovação de diluente; T2 – sêmen refrigerado com renovação diária de diluente mediante centrifugação à 800×g por 10 minutos, utilizando centrífuga refrigerada (MPW Med. Instruments, Varsóvia, Polônia) à 5°C; e T3 – sêmen refrigerado com renovação diária de diluente mediante centrifugação à 800×g por 10 minutos, utilizando centrífuga de bancada (Fanem, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente (20 °C). Após fracionamento, realizou-se a diluição com diluente citrato-gema 20% de forma a obter 150 milhões de espermatozoides por 0,25 mL. Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brasil) com curva de resfriamento para 5 °C. No tempo 24, 48 e 72h da entrada das amostras no Botuflex, foram retiradas alíquotas de cada tratamento para análise da atividade mitocondrial utilizando o corante 3,3'-diaminobenzidine (DAB) com 1 mg/mL de fosfato salino tamponado (PBS), e análise de cromatina utilizando solução de Carnoy e azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine, pH 4,0. Após a retirada das alíquotas, as amostras dos tratamentos com renovação de diluente foram submetidas à centrifugação, de acordo com o tratamento, o sobrenadante descartado e o *pellet* de espermatozoide ressuspenso com novo diluente refrigerado à 5 °C. Todas as amostras eram armazenadas novamente no Botuflex, no qual os gelos eram substituídos a cada processamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal, foi aplicado a ANOVA e o teste Tukey. Para as variáveis sem distribuição normal, foi realizado o teste Kruskal Wallis ajustado. Adotou-se o nível de 5% de significância em todas as avaliações. A atividade mitocondrial e compactação da cromatina não diferiu entre os tratamentos após 24, 48 e 72 horas de resfriamento (P>0,05). Com 72 horas de resfriamento, os tratamentos apresentavam os seguintes percentuais de espermatozoides com atividade mitocondrial completa e média, respectivamente: T1- 1,50±1,00%, 55,80±31,60%; T2- 1,00±10,75%, 52,80±16,57%; T3- 9,50±24,25%, 53,50±19,11%. Com 72 horas de resfriamento T1, T2 e T3 apresentaram os seguintes percentuais de espermatozoides com cromatina íntegra: 98,60±0,80%; 99,20±0,70%; 98,80±2,30%, respectivamente. Observa-se que a renovação de diluente e a utilização da centrífuga de bancada a 20 °C para renovação não interferiu na atividade mitocondrial e na integridade do DNA de espermatozoides de caprinos, refrigerados à 5 °C por até 72 horas.

Palavras-chaves: centrifugação seminal, viabilidade espermática, espermatozoides

Effect of diluent renewal at different temperatures on mitochondrial activity and chromatin integrity in refrigerated goat semen

Caene Borges dos Santos¹, Diego Silva Macedo², Maria Clara Bastos Rodrigues¹, Alana Graziella Ferreira de Jesus Silva¹, Rosileia Silva Souza¹, Gabriela Montenegro Paiva¹, Ana Lúcia Almeida Santana¹, Larissa Pires Barbosa^{1*}

¹Federal University of the Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas- Bahia

²Federal Rural University of Pernambuco, Recife- Pernambuco

*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

The use of chilled goat semen provides the sperm cell up to 48 hours of storage time. During this interval, biochemical changes occur in the extender that negatively affect sperm viability, such as the accumulation of reactive oxygen species (ROS) that lead to lipid peroxidation and consequent decline in seminal quality. It is known that diluent renewal is an alternative to prolong sperm viability, because, more than removing toxic products of sperm metabolism, it also may provide a new source of nutrients to the spermatozoa with the adding of a new diluent. The need for refrigerated centrifugation makes it difficult to carry out the renewal technique in the field. Thinking about the effectiveness of the technique in the field and evaluating whether the use of a benchtop centrifuge at room temperature (20°C), replacing the refrigerated centrifuge, would result in sperm damage caused by thermal shock, this study aimed to evaluate the effect of extender renewal at different temperatures on mitochondrial activity and chromatin integrity in chilled goat semen. The project was carried out in the goat sector of the Federal University of the Recôncavo of Bahia, located in the municipality of Cruz das Almas, Bahia, from May to June, 2022. Five adult crossbred bucks were used, with a body condition score of 3.0±0.5, kept in an extensive rearing system on pasture formed by *Brachiaria decumbens* and *ad libitum* water. Semen collections were performed once a week, for five consecutive weeks, with the aid of an artificial vagina, using an estrogenized female as a dummy. Immediately after collection, the semen was analyzed for volume, aspect, mass movement, progressive sperm motility and sperm vigor. Samples within the minimal standard, established by the Brazilian College of Animal Reproduction, were grouped into a pool. After pool formation, semen characteristics were re-evaluated and the pool was equally aliquoted into three treatments (T) (n=5): T1 - control, chilled semen without diluent renewal; T2 - chilled semen with daily diluent renewal by centrifugation at 800×g for 10 minutes using a refrigerated centrifuge (MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland) at 5°C and T3 - chilled semen with daily diluent renewal by centrifugation at 800×g for 10 minutes, using benchtop centrifuge (Fanem, São Paulo, Brazil) at room temperature (20 °C). After fractionation, dilution was performed with a citrate-egg yolk 20% extender to obtain 150 million spermatozoa per 0.25 mL. After dilution, the samples were placed in Botuflex (Botupharma, São Paulo, Brazil) with a cooling curve to 5 °C. After 24, 48, and 72 hours aliquots of each treatment were removed from Botuflex and used to analyze mitochondrial activity using the dye 3,3'-diaminobenzidine (DAB) with 1 mg/mL of phosphate buffered saline (PBS), and chromatin analysis using Carnoy's solution and 0.025% toluidine blue in McIlvaine buffer, pH 4.0. After removing the aliquots, the samples from the treatments with diluent renewal were subjected to centrifugation, according to the treatment, the supernatant was discharged and the sperm pellet was resuspended with a new diluent cooled at 5 °C. All samples were stored again in Botuflex, whose ices were replaced at each processing. The data were evaluated for normality using the Shapiro-Wilk test. For the variables with normal distribution, ANOVA and Tukey Test were applied. For variables without normal distribution, the adjusted Kruskal Wallis test was performed. A significance level of 5% was adopted for all assessments. Mitochondrial activity and chromatin integrity did not differ among treatments at 24, 48, and 72 hours (P>0.05). After 72 hours of chilling, the treatments presented the following percentages of spermatozoa with complete and average mitochondrial activity, respectively: T1- 1.50±1.00%, 55.80±31.60%; T2- 1.00±10.75%, 52.80±16.57%; T3- 9.50±24.25%, 53.50±19.11%. After 72 hours of chilling T1, T2, and T3 presented the following percentages of spermatozoa with intact chromatin: 98.60±0.80%; 99.20±0.70%; 98.80±2.30%, respectively. It was observed that the diluent renewal and the use of bench centrifuge at 20 °C for extender renewal did not interfere with mitochondrial activity and DNA integrity of goat spermatozoa, chilled at 5 °C for up to 72 hours.

Keywords: semen centrifugation, sperm viability, spermatozoa