

## Influência do volume da palheta na criopreservação de espermatozoides de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Douglas Martins Ceconello<sup>1</sup>, Renan Cassaroto Appel<sup>2</sup>, Vinicius Wagner Silva<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>, Laurival Antônio Vilas Bôas<sup>3</sup>, Lucienne Garcia Pretto Giordano<sup>1</sup>, Jorge Manuel de Oliveira Fernandes<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina, Paraná - Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Biociências e Aquicultura – Nord University, Bodø, Norway

<sup>3</sup>Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Paraná - Brasil

\*e-mail: imartins@uel.br

No Brasil, a tilápia do Nilo atualmente é considerada a principal espécie na produção de peixes cultivados, devido a facilidade em se adaptar a várias condições ambientais, ter precocidade reprodutiva e ser uma fonte de proteína saudável e de baixo custo. Nesse contexto, a criopreservação de espermatozoides se torna uma biotecnologia reprodutiva importante, permitindo o transporte da genética de linhagens desejadas para diferentes criadouros, no entanto, é um processo que causa grande estresse celular e impõe condições desfavoráveis para a viabilidade dos espermatozoides. No intuito de reduzir os danos causados na estrutura e na funcionalidade dos espermatozoides durante a criopreservação, tornam-se necessários estudos sobre o processo ideal de envase e congelamento das amostras de sêmen. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do volume da palheta na criopreservação de espermatozoides de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Foram utilizados oito animais, mantidos em um sistema de recirculação aquícola (RAS) de 1500 litros, com temperatura entre 27 e 30°C. Os animais foram anestesiados em uma solução de óleo de cravo (120ppm) diluída em água, e as colheitas foram por massagem abdominal. O ejaculado foi mantido a 4°C até o início das análises. Para análise da cinética espermática a amostra foi ativada com água do tanque a 27-30°C em uma proporção de 1:10 e 3 µL foram depositados em uma lâmina Cell-Vu<sup>®</sup> e após dez segundos avaliada pelo sistema CASA (SCA<sup>®</sup> - Sperm Class Analyzer) com configuração para peixes. Para criopreservação a amostra foi diluída em uma proporção 1:3 em meio composto por diluente iônico (75mMol L<sup>-1</sup> NaCl; 70 mMol L<sup>-1</sup> KCl; 2 mMol L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 1 mMol L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> e 20 mMol L<sup>-1</sup> Tris – pH = 8,0), com crioprotetor metanol 10% e com antioxidante taurina (1 mMol L<sup>-1</sup>); e foram envasadas e divididas em três grupos: S0,5 (envasadas em palhetas 0,5 mL), S0,5C (envasadas em palhetas 0,5 cortadas ao meio) e S0,25 (envasadas em palhetas 0,25 mL), congeladas e armazenadas em botijão de nitrogênio líquido. A descongelamento foi em banho-maria a 30°C por 30 segundos. Para a comparação entre os grupos: fresco, S0,5, S0,5C e S0,25, foi utilizado a ANOVA, considerando o nível de significância de 5%. Foi identificada diferença significativa para os parâmetros: MT (Fresco: 98,03 ± 5,33 x S0,5: 55 ± 7,35 x S0,5C: 71,84 ± 6,85 x S0,25: 51,48 ± 11,36; P<0,001), MP (Fresco: 55,11 ± 14,85 x S0,5: 21,11 ± 10,53 x S0,5C: 29,90 ± 9,12 x S0,25: 21,85 ± 8,89; P<0,001), RAPID cells (Fresco: 29,58 ± 11,30 x S0,5: 3,59 ± 2,52 x S0,5C: 7,3 ± 6,6 x S0,25: 3,43 ± 2,79; P<0,001), MEDIUM cells (Fresco: 34,94 ± 9,48 x S0,5: 17,77 ± 11,54 x S0,5C: 23,24 ± 8,81 x S0,25: 19,88 ± 8,57; P: 0,007), STATIC cells (Fresco: 6,91 ± 5,33 x S0,5: 49,31 ± 12,25 x S0,5C: 28,15 ± 6,85 x S0,25: 48,51 ± 11,35; P<0,001), VCL (Fresco: 71,26 ± 9,32 x S0,5: 51,81 ± 7,91 x S0,5C: 54,45 ± 8,28 x S0,25: 52,34 ± 6,51; P<0,001), ALH (Fresco: 1,52 ± 0,24 x S0,5: 0,89 ± 0,21 x S0,5C: 0,95 ± 0,1 x S0,25: 0,83 ± 0,07; P<0,001), BCF (Fresco: 14,63 ± 1,25 x S0,5: 16,16 ± 2,33 x S0,5C: 15,31 ± 1,75 x S0,25: 17,04 ± 1,11; P: 0,03), WOBBLE (Fresco: 71,65 ± 4,32 x S0,5: 81,06 ± 10,63 x S0,5C: 83,63 ± 3,33 x S0,25: 83,62 ± 2,04; P<0,001). A criopreservação em palhetas S0,50C apresentou melhores resultados de cinética espermática pós descongelamento em comparação aos grupos S0,5 e S0,25, sugerindo-a como alternativa nos protocolos de congelamento de espermatozoides de tilápia do Nilo.

**Palavras-chave:** espermatozoide; peixe; envase, qualidade espermática.

**Agradecimentos:** Ao Conselho de Pesquisa da Noruega (projeto n ° 310103) pela colaboração e bolsa de estudos pelo projeto Norbraqua. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado.

## **Influence of straw volume on cryopreservation of Nile tilapia spermatozoa (*Oreochromis niloticus*)**

**Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Douglas Martins Ceconello<sup>1</sup>, Renan Cassaroto Appel<sup>2</sup>, Vinicius Wagner Silva<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>, Laurival Antônio Vilas Bôas<sup>3</sup>, Lucienne Garcia Pretto Giordano<sup>1</sup>, Jorge Manuel de Oliveira Fernandes<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup> Center of Agrarian Sciences – State University of Londrina, Paraná, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Bioscience and Aquaculture – Nord University, Bodø, Norway

<sup>3</sup> Center of Biological Sciences – State University of Londrina, Paraná, Brazil

\*e-mail: imartins@uel.br

In Brazil, Nile Tilapia is currently considered the main species in the production of farmed fish, due to its ease in adapting to various environmental conditions, having precocious reproductive maturity and being a healthy and low-cost protein. In this context, sperm cryopreservation becomes an important reproductive biotechnology, allowing the genetics transport of the genetics of the best strains to different breeding sites. However, it is a process that causes great cellular stress and imposes unfavorable conditions for sperm viability. In order to reduce the damage caused to the structure and functionality of spermatozoa during cryopreservation, studies on the ideal process for freezing and packaging semen samples are necessary. This study aimed to evaluate the influence of straw volume on the cryopreservation of Nile tilapia spermatozoa. Eight animals were used, kept in a 1500 liter aquaculture recirculation system (RAS), with a temperature between 27 and 30°C. The animals were previously anesthetized in a clove oil solution (120ppm) diluted in water and the samples were collected by abdominal massage. The ejaculate was kept at 4°C until the analysis began. To analyze sperm kinetics, the sample was activated with water from the tank at 27-30°C in a ratio of 1:10 and 3 µL were deposited on a Cell-Vu<sup>®</sup> slide and after ten seconds evaluated by the CASA system (SCA<sup>®</sup> - Sperm Class Analyzer) with setup for fish. For cryopreservation, the sample was diluted in a 1:3 ratio in a extender composed of ionic extender (75mMol L-1 NaCl; 70mMol L-1 KCl; 2mMol L-1 CaCl<sub>2</sub>; 1mMol L-1 MgSO<sub>4</sub> and 20mMol L-1 Tris – pH = 8.0), with methanol cryoprotectant (10%) and taurine antioxidant (1mMol). The samples were filled and divided into 3 different groups: S0.5 (samples filled in straws 0, 5 mL), SC0.5 (samples filled in 0.5 straws cut in half) and S0.25 (samples filled in 0.25 mL straws), frozen and stored in a cryotank. Thawing was in a water bath at 30°C for 30 seconds. To compare the groups: fresh, S0.5, SC0.5 and S0.25, ANOVA was used, considering a significance level of 5%. A significant difference was identified for the parameters: MT (Fresh: 98.03 ± 5.33 x S0.5: 55 ± 7.35 x S0.5C: 71.84 ± 6.85 x S0.25: 51.48 ± 11.36; P<0.001), MP (Fresh: 55.11 ± 14.85 x S0.5: 21.11 ± 10.53 x S0.5C: 29.90 ± 9.12 x S0.25: 21.85 ± 8.89; P<0.001), RAPID cells (Fresh: 29.58 ± 11.30 x S0.5: 3.59 ± 2.52 x S0.5C: 7.3 ± 6.6 x S0.25: 3.43 ± 2.79; P<0.001), MEDIUM cells (Fresh: 34.94 ± 9.48 x S0.5: 17.77 ± 11.54 x S0.5C: 23.24 ± 8.81 x S0.25: 19.88 ± 8.57; P: 0.007), STATIC cells (Fresh: 6.91 ± 5.33 x S0.5: 49.31 ± 12.25 x S0.5C: 28.15 ± 6.85 x S0.25: 48.51 ± 11.35; P<0.001), VCL (Fresh: 71.26 ± 9.32 x S0.5: 51.81 ± 7.91 x SC0.5: 54.45 ± 8.28 x S0.25: 52.34 ± 6.51; P<0.001), ALH (Fresh: 1.52 ± 0.24 x S0.5: 0.89 ± 0.21 x S0.5C: 0.95 ± 0.1 x S0.25: 0.83 ± 0.07; P<0.001), BCF (Fresh: 14.63 ± 1.25 x S0.5: 16.16 ± 2.33 x S0.5C: 15.31 ± 1.75 x S0.25: 17.04 ± 1.11; P: 0.03), WOBBLE (Fresh: 71.65 ± 4.32 x S0.5: 81.06 ± 10.63 x S0.5C: 83.63 ± 3.33 x S0.25: 83.62 ± 2.04; P<0.001). Cryopreservation in SC0.50 straws showed better post-thawing sperm kinetics results compared to the S0.5 and S0.25 groups, suggesting it as an alternative in Nile tilapia sperm freezing protocols.

**Keywords:** spermatozoa, fish, filling semen, sperm quality.

**Acknowledgment:** To the Research Council of Norway (project nº 310103) for collaboration and scholarship by the Norbraqua project. To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the scholarship.

## Microscopia eletrônica como apoio ao diagnóstico em alterações morfológicas de espermatozoides – relato de caso

Diego Corrêa Silveira<sup>1\*</sup>, Gabriel Maggi<sup>2</sup>, Marcelo Brandi Vieira<sup>1</sup>, Ingrid Gracielle Martins da Silva<sup>3</sup>, Karine Brenda Barros-Cordeiro<sup>3</sup>, Neimar Corrêa Severo<sup>4</sup>, Sônia Nair Bão<sup>3</sup>, Rafael Gianella Mondadori<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Progen Inseminação Artificial, Dom Pedrito, RS; <sup>2</sup>Instituto de Biologia, Grupo de Fisiopatologia e Biotécnicas da Reprodução Animal (FiBRA-UFPel), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS; <sup>3</sup>Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF; <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET), Uberlândia, MG

\* E-mail: diego@progen.agr.br

A avaliação da morfologia espermática na rotina dos exames andrológicos de touros é realizada através da microscopia óptica em amostras coradas ou em amostras úmidas entre lâmina e lamínula. As técnicas mais utilizadas em centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) são as amostras úmidas em contraste de fase (CF) ou contraste de interferência diferencial (DIC). Amostras coradas são mais utilizadas nos exames andrológicos para seleção de touros no campo. Este estudo investigou o caso de um touro Brangus com 5 anos de idade que apresentava defeitos na peça intermediária do espermatozoide com uma alta taxa de rejeição de partidas de sêmen *in natura* e congelado, sem redução na cinemática espermática. O touro foi coletado durante 16 meses para processamento de sêmen e, esta investigação envolveu 28 ejaculados coletados com vagina artificial. As amostras analisadas apresentaram alto percentual de defeitos na morfologia da peça intermediária com média de 37,73% de alterações, porém, com uma motilidade normal dos espermatozoides, sem diferenças marcantes nos dados cinemáticos tanto antes como após a congelamento. A morfologia espermática foi avaliada em contraste de fase com aumento de 1000 vezes (Zeiss Axioscope™, Zeiss Alemanha) e a cinemática espermática foi avaliada através do sistema de análise computadorizada (CASA CEROS II™, IMV, França). Para compreender melhor o quadro clínico-andrológico do doador de sêmen amostras de sêmen *in natura* e congelado foram fixadas e encaminhadas para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). A microscopia eletrônica identificou descontinuidades na bainha mitocondrial, características da aplasia da peça intermediária. Além disso, a microscopia eletrônica revelou defeitos na membrana plasmática, vacúolos e descondensação da cromatina, consistentes com achados anteriores que relacionam anomalias do acrossoma com defeitos da peça intermediária. Os achados ressaltam a necessidade de realizar avaliações laboratoriais completas antes de liberar o sêmen criopreservado para comercialização. Apesar das alterações morfológicas substanciais, os dados iniciais de avaliação do sêmen indicaram níveis aceitáveis de cinemática espermática, enfatizando a resistência da produção de espermatozoides a alterações morfológicas graves. Este relato de caso serve como uma contribuição crucial para a compreensão dos defeitos da peça intermediária em espermatozoides de touro, destacando a necessidade de avaliação metódica e controle de qualidade no processamento e comercialização de sêmen. O diagnóstico presuntivo do quadro clínico-andrológico remete a disfunção da bainha da peça intermediária associada a alterações na cromatina nuclear e membrana citoplasmática. Como o reprodutor não foi utilizado para a monta natural ou inseminação artificial, os dados da fertilidade são desconhecidos. Foi recomendado o descarte do reprodutor como doador de sêmen pelas implicações produtivas e possível origem genética das alterações de acordo com relatos da literatura.

**Palavras-chave:** andrologia bovina, patologia espermática, controle de qualidade, seleção de reprodutores

## Electronic microscopy to support the diagnosis of morphological changes in sperm – case report

Diego Corrêa Silveira<sup>1\*</sup>, Gabriel Maggi<sup>2</sup>, Marcelo Brandi Vieira<sup>1</sup>, Ingrid Gracielle Martins da Silva<sup>3</sup>, Karine Brenda Barros-Cordeiro<sup>3</sup>, Neimar Corrêa Severo<sup>4</sup>, Sônia Nair Bão<sup>3</sup>, Rafael Gianella Mondadori<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Progen Inseminação Artificial, Dom Pedrito, RS; <sup>2</sup>Instituto de Biologia, Grupo de Fisiopatologia e Biotécnicas da Reprodução Animal (FiBRA-UFPel), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS; <sup>3</sup>Laboratório de Microscopia e Microanálise, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF; <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET), Uberlândia, MG

\* E-mail: diego@progen.agr.br

The evaluation of sperm morphology in routine andrological examinations of bulls is carried out using optical microscopy on stained samples or on wet samples between the slide and coverslip. The most used techniques in semen collection and processing centers (SCPC) are wet samples in phase contrast (PC) or differential interference contrast (DIC). Stained samples are most used in andrological examinations to select bulls in the field. This study investigated the case of a 5-year-old Brangus bull that presented defects in the sperm midpiece with a high rejection rate of batches of fresh and frozen semen, without reduction in sperm kinematics. The bull was collected for 16 months for semen processing and this investigation involved 28 ejaculates collected with an artificial vagina. The samples analyzed showed a high percentage of defects in the morphology of the midpiece with an average of 37.73% of changes, however, with normal sperm motility, without marked differences in kinematic data both before and after freezing. Sperm morphology was evaluated using phase contrast at 1000x magnification (Zeiss Axioscope™, Zeiss Germany) and sperm kinematics was evaluated using a computerized analysis system (CASA CEROS II™, IMV, France). To better understand the clinical-andrological condition of the semen donor, fresh and frozen semen samples were fixed and sent for analysis using transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). Electron microscopy identified discontinuities in the mitochondrial sheath, characteristic of midpiece aplasia. Furthermore, electron microscopy revealed defects in the plasma membrane, vacuoles, and chromatin decondensation, consistent with previous findings linking acrosome abnormalities with midpiece defects. The findings highlight the need to perform thorough laboratory evaluations before releasing cryopreserved semen for sold. Despite substantial morphological changes, initial semen evaluation data indicated acceptable levels of sperm kinematics, emphasizing the resistance of sperm production to severe morphological changes. This case report serves as a crucial contribution to the understanding of midpiece defects in bull sperm, highlighting the need for meticulous assessment and quality control in semen processing and marketing. The presumptive diagnosis of the clinical-andrological condition refers to midpiece sheath dysfunction associated with changes in the nuclear chromatin and cytoplasmic membrane. As the bull was not used for natural breeding or artificial insemination, fertility data are unknown. It was recommended to discard the stud as a semen donor due to the productive implications and possible genetic origin of the changes, according to reports in the literature.

**Keywords:** bovine andrology, sperm pathology, quality control, sire selection

## Efeito antioxidante dos ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) na criopreservação de espermatozoides bovinos

Micherlene da Silva Carneiro Lustosa<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>2</sup>, Raniel Lustosa de Moura<sup>1</sup>; Marlon de Araújo Castelo Branco<sup>3</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>4</sup>, Jefferson Hallison Lustosa da Silva<sup>4</sup>; Geraldo Magela Cortes Carvalho<sup>5</sup>; Talita Soares Câmara<sup>6</sup>; Samara Dias Cardoso Rodrigues<sup>7</sup>; Bruna Farias Brito<sup>8</sup>; Francisco Cardoso Figueiredo<sup>4</sup>; José Adalmir Torres de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, IESM – Timon, MA, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal (LFRA), UFMA, Chapadinha, MA, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de raiva, CCZ, Teresina, PI, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), UFPI, Teresina, PI, Brasil

<sup>5</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte, Teresina, PI, Brasil

<sup>6</sup>Empresa Farmina Nordeste - Fortaleza, CE, Brasil

<sup>7</sup>Universidade Federal do Tocantins, Araguatins, Tocantins, Brasil

<sup>8</sup>Centro Universitário Fametro, UNIFAMETRO – Fortaleza, CE, Brasil

Email: yndyra.nayan@ufma.br

A utilização de diluidores seminais acrescidos com antioxidantes pode promover benefícios, minimizando ou revertendo os efeitos deletérios aos espermatozoides, produzidos pelas espécies reativas do oxigênio (ROS). No presente estudo objetivou-se avaliar a eficiência dos ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) como antioxidante na criopreservação de sêmen bovino. As coletadas de sêmen foram feitas em seis bovinos Curraleiro Pé-Duro, com idade entre 4 e 6 anos, uma vez por semana, durante sete semanas, por eletro ejaculação. Imediatamente após a coleta as amostras de sêmen de cada animal foram colocadas em banho Maria a 37°C e avaliadas separadamente quando cor, aspecto, volume, turbilhonamento, motilidade total e vigor, em microscópio de contraste de fase. Apenas ejaculados com turbilhonamento  $\geq 3$ ; motilidade total  $\geq 80\%$ ; vigor  $\geq 3$ ; concentração espermática  $\geq 3,5 \times 10^9$  espermatozoides/mL e patologias espermáticas  $\leq 20\%$  foram utilizados nesse estudo. Quando aprovadas, as amostras dos seis ejaculados foram misturadas para formação de um pool, em seguida este foi dividido em quatro alíquotas e diluídas em meio Tris-Gema (37°C) contendo diferentes concentrações de ésteres de pequi (0,5 mL/L, 1,0 mL/L e 1,5 mL/L), enquanto uma alíquota sem nenhuma suplementação foi mantida como controle. O sêmen diluído foi envasado em palheta de 0,25mL, com concentração final de  $160 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Posteriormente foram congeladas em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), na curva de congelamento rápida (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C), e, após atingirem -120°C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Após descongelamento a 37°C/30seg as amostras foram avaliadas quanto a quantificação da glutatona reduzida e de malonaldeídos, e quanto a taxa de clivagem, e a produção in vitro de embriões. A taxa de clivagem e a produção de blastocisto foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado a 5% de probabilidade de erro. A quantificação da glutatona reduzida e de malonaldeídos foi submetida a Análise de Variância (ANOVA), seguido de Tukey como post hoc teste, na probabilidade de 5%. Não foi observado diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos e o controle quanto a taxa de clivagem, taxa de embriões e quantificação de glutatona reduzida. A análise de peroxidação lipídica dos espermatozoides após descongelamento reduziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a concentração de malonaldeídos nos tratamentos com 1,0 mL/L e 1,5 mL/L de ésteres de pequi em relação ao controle e ao tratamento de 0,5mL de ésteres de pequi. Em conclusão os ésteres de pequi nas concentrações de 1,0 e 1,5mL/L reduziu a produção de malonaldeídos, sugerindo atividade antioxidante do pequi.

**Palavras-chave:** Espécies reativas de oxigênio; malonaldeído; Curraleiro Pé Duro.

## Antioxidant effect of pequi (*Caryocar coriaceum*) esters on bovine sperm cryopreservation

Micherlene da Silva Carneiro Lustosa<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>2</sup>, Raniel Lustosa de Moura<sup>1</sup>; Marlon de Araújo Castelo Branco<sup>3</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>4</sup>, Jefferson Hallison Lustosa da Silva<sup>4</sup>; Geraldo Magela Cortes Carvalho<sup>5</sup>; Talita Soares Câmara<sup>6</sup>; Samara Dias Cardoso Rodrigues<sup>7</sup>; Bruna Farias Brito<sup>8</sup>; Francisco Cardoso Figueiredo<sup>4</sup>; José Adalmir Torres de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Physiology and Reproduction, IESM - Timon, MA, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Physiology and Reproduction (LFRA), UFMA, Chapadinha, MA, Brazil

<sup>3</sup>Rabies laboratory, CCZ, Teresina, PI, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Animal Reproduction Biotechnology (LBRA), UFPI, Teresina, PI, Brazil

<sup>5</sup>Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Meio Norte, Teresina, PI, Brazil

<sup>6</sup>Empresa Farmina Nordeste - Fortaleza, CE, Brazil

<sup>7</sup>Federal University of Tocantins, Araguatins, Tocantins, Brazil

<sup>8</sup>Fametro University Center, UNIFAMETRO - Fortaleza, CE, Brazil

Email: yndyra.nayan@ufma.br

The use of seminal diluents supplemented with antioxidants can promote benefits by minimizing or reversing the deleterious effects on sperm produced by reactive oxygen species (ROS). The aim of this study was to evaluate the efficiency of pequi (*Caryocar coriaceum*) esters as antioxidants in the cryopreservation of bovine semen. Semen was collected from six Curraleiro Pé-Duro cattle, aged between 4 and 6 years, once a week for seven weeks by electroejaculation. Immediately after collection, the semen samples from each animal were placed in a bain marie at 37°C and evaluated separately for color, appearance, volume, turbidity, total motility and vigor under a phase contrast microscope. Only ejaculates with turbidity  $\geq 3$ ; total motility  $\geq 80\%$ ; vigor  $\geq 3$ ; sperm concentration  $\geq 3.5 \times 10^9$  sperm/mL and sperm pathologies  $\leq 20\%$  were used in this study. When approved, the samples from the six ejaculates were mixed to form a pool, then this was divided into four aliquots and diluted in Tris-Gema medium (37°C) containing different concentrations of pequi esters (0.5 mL/L, 1.0 mL/L and 1.5 mL/L), while an aliquot without any supplementation was kept as a control. The diluted semen was filled into 0.25mL straws, with a final concentration of  $160 \times 10^6$  sperm/mL. They were then frozen in a TK 3000<sup>®</sup> machine (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brazil), using the fast freezing curve (-0.25°C/min, from 25°C to 5°C and -20°C/min, from 5°C to -120°C), and after reaching -120°C, the straws were stored in liquid nitrogen (-196°C). After thawing at 37°C/30sec, the samples were evaluated for the quantification of reduced glutathione and malonaldehyde, the cleavage rate and the in vitro production of embryos. The cleavage rate and blastocyst production were evaluated using the chi-square test at a 5% probability of error. The quantification of reduced glutathione and malonaldehyde was subjected to Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test at 5% probability. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) between the treatments and the control in terms of cleavage rate, embryo rate and quantification of reduced glutathione. Analysis of sperm lipid peroxidation after thawing significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the concentration of malonaldehydes in the treatments with 1.0 mL/L and 1.5 mL/L of pequi esters compared to the control and the treatment with 0.5 mL of pequi esters. In conclusion, pequi esters at concentrations of 1.0 and 1.5mL/L reduced the production of malonaldehydes, suggesting the antioxidant activity of pequi.

**Keywords:** Reactive Oxygen Species; malonaldehydes; Curraleiro Pé Duro.

## Efeito dos ésteres de pequi (*Caryocar coriaceum*) na criopreservação de espermatozoides bovinos

Micherlene da Silva Carneiro Lustosa<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>2</sup>, Raniel Lustosa de Moura<sup>1</sup>, Marlon de Araújo Castelo Branco<sup>3</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>4</sup>, Jefferson Hallison Lustosa da Silva<sup>4</sup>, Geraldo Magela Cortes Carvalho<sup>5</sup>, Talita Soares Câmara<sup>6</sup>, Samara Dias Cardoso Rodrigues<sup>7</sup>, Bruna Farias Brito<sup>8</sup>, Francisco Cardoso Figueiredo<sup>4</sup>, José Adalmir Torres de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, IESM – Timon, MA, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal (LFRA), UFMA, Chapadinha, MA, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Raiva, CCZ, Teresina, PI, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA), UFPI, Teresina, PI, Brasil

<sup>5</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Meio Norte, Teresina, PI, Brasil

<sup>6</sup> Empresa Farmina Nordeste - Fortaleza, CE, Brasil

<sup>7</sup> Universidade Federal do Tocantins - UFTO, Araguatins, Tocantins, Brasil

<sup>8</sup> Centro Universitário Fametro, UNIFAMETRO – Fortaleza, CE, Brasil

Email: yndyra.nayan@ufma.br

A criopreservação causa estresses físicos e bioquímicos nos espermatozoides alterando a composição lipídica da membrana espermática e, subsequentemente, variáveis de qualidade. Objetivou-se avaliar se os ésteres de pequi (EP) são capazes de melhorar a criopreservação seminal. Sete ejaculados de seis bovinos Curraleiro Pé-Duro foram coletados e divididos em quatro tratamentos experimentais: consistindo em controle (tris-gema), Tratamento 1 (tris-gema + 0,5 mL/L de EP), Tratamento 2 (tris-gema+1,0 mL/L de EP), e Tratamento 3 (tris-gema+1,5 mL/L de EP), para uma concentração final de  $160 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Posteriormente, foram armazenadas em palhetas (0,25mL) e congeladas em máquina TK 3000® (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), na curva de congelamento rápida (-0,25°C/min, de 25°C a 5°C e -20°C/min, de 5°C a -120°C), e, após atingirem -120°C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). Após descongelamento a 37°C/30seg as amostras foram avaliadas quanto a cinética espermática, por meio de um sistema analisador de espermatozoide auxiliado por computador (CASA), quanto a integridade da membrana plasmática (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), e membrana acrossomal (isotiocianato de fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), com uso de sondas fluorescentes, analisadas em microscopia de epifluorescência, após incubação a 37°C/10 minutos e avaliadas a cada 60 minutos até 180 minutos, e avaliação de morfologia espermática pela técnica de câmara úmida, avaliada em microscopia óptica. O delineamento experimental foi em bloco ao acaso. As variáveis estudadas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento modelos lineares gerais (Proc GLM) e para comparação de média foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls (SNK), na probabilidade de 5%. As análises foram executadas através do programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2013). A análise da cinética espermática nas concentrações de 0,5 mL/L, 1,0 mL/L e 1,5 mL/L de EP, não diferiram estatisticamente entre os grupos experimentais, como também não houve diferença estatística entre os grupos experimentais e o controle ( $p>0,05$ ). Observou-se que a concentração de 1,5 mL/L de EP melhorou significativamente ( $P<0,05$ ) a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides em relação aos demais grupo e ao controle com as amostras incubadas a 37°C com sonda por 180 min. A integridade acrossomal e a morfologia espermática manteve-se semelhante em todos os tratamentos não diferindo estatisticamente ( $P>0,05$ ). Conclui-se que os ésteres de pequi nas concentrações de 0,5 mL/L, 1,0 mL/L e 1,5 mL/L não melhoraram os parâmetros de cinética, integridade acrossomal e morfologia espermática, mas a concentração 1,5 mL/L melhorou a integridade da membrana plasmática.

**Palavras chave:** Cinética espermática; Curraleiro Pé Duro; Membrana plasmática.

## Effect of pequi (*Caryocar coriaceum*) esters on bovine sperm cryopreservation

Micherlene da Silva Carneiro Lustosa<sup>1</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>2</sup>, Raniel Lustosa de Moura<sup>1</sup>; Marlon de Araújo Castelo Branco<sup>3</sup>, Isolda Márcia Rocha do Nascimento<sup>4</sup>, Jefferson Hallison Lustosa da Silva<sup>4</sup>; Geraldo Magela Cortes Carvalho<sup>5</sup>; Talita Soares Câmara<sup>6</sup>; Samara Dias Cardoso Rodrigues<sup>7</sup>; Bruna Farias Brito<sup>8</sup>; Francisco Cardoso Figueiredo<sup>4</sup>; José Adalmir Torres de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Physiology and Reproduction, IESM - Timon, MA, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Physiology and Reproduction (LFRA), UFMA, Chapadinha, MA, Brazil

<sup>3</sup>Rabies laboratory, CCZ, Teresina, PI, Brazil

<sup>4</sup>Laboratory of Animal Reproduction Biotechnology (LBRA), UFPI, Teresina, PI, Brazil

<sup>5</sup>Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA Meio Norte, Teresina, PI, Brazil

<sup>6</sup>Empresa Farmina Nordeste - Fortaleza, CE, Brazil

<sup>7</sup>Federal University of Tocantins, Araguatins, Tocantins, Brazil

<sup>8</sup>Fametro University Center, UNIFAMETRO - Fortaleza, CE, Brazil

E.mail: yndyra.nayan@ufma.br

Cryopreservation causes physical and biochemical stress on sperm, altering the lipid composition of the sperm membrane and, subsequently, quality variables. The aim was to assess whether pequi esters (PE) are capable of improving seminal cryopreservation. Seven ejaculates from six Curraleiro Pé-Duro cattle were collected and divided into four experimental treatments: control (tris-yolk), Treatment 1 (tris-yolk + 0.5 mL/L of EP), Treatment 2 (tris-yolk+1.0 mL/L of EP), and Treatment 3 (tris-yolk+1.5 mL/L of EP), for a final concentration of  $160 \times 10^6$  sperm/mL. They were then stored in straws (0.25mL) and frozen in a TK 3000® machine (TK Tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, Brazil), on the fast freezing curve (-0.25°C/min, from 25°C to 5°C and -20°C/min, from 5°C to -120°C), and after reaching -120°C, the straws were stored in liquid nitrogen (-196°C). After thawing at 37°C/30sec, the samples were evaluated for sperm kinetics using a computer-assisted sperm analyzer system (CASA), for plasma membrane integrity (carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), and for sperm integrity (carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), and acrosomal membrane (fluorescein isothiocyanate conjugated to Peanut agglutinin, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), using fluorescent probes, analyzed using epifluorescence microscopy, after incubation at 37°C/10 minutes and evaluated every 60 minutes until 180 minutes, and evaluation of sperm morphology using the wet chamber technique, evaluated using optical microscopy. The experimental design was a randomized block. The variables studied were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the general linear models procedure (Proc GLM) and the Student-Newman-Keuls (SNK) test was used to compare the means, with a probability of 5%. The analyses were carried out using the Statistical Analysis System program (SAS Institute Inc, 2013). The analysis of sperm kinetics at concentrations of 0.5 mL/L, 1.0 mL/L and 1.5 mL/L of EP did not differ statistically between the experimental groups, nor was there any statistical difference between the experimental groups and the control ( $p > 0.05$ ). It was observed that the concentration of 1.5 mL/L of EP significantly improved ( $P < 0.05$ ) the integrity of the plasma membrane of the sperm in relation to the other groups and the control with the samples incubated at 37°C with a probe for 180 min. Acrosomal integrity and sperm morphology remained similar in all treatments and did not differ statistically ( $P > 0.05$ ). It can be concluded that pequi esters at concentrations of 0.5 mL/L, 1.0 mL/L and 1.5 mL/L did not improve the parameters of sperm kinetics, acrosomal integrity and morphology, but the concentration of 1.5 mL/L improved the integrity of the plasma membrane.

**Key words:** Sperm kinetics; Curraleiro Pé Duro; Plasma membrane.



## Termorregulação testicular e sua relação com qualidade espermática em touros

Carlos Eduardo Leandro Campos<sup>1</sup>, Nívia Maria Rocha Brandao<sup>1</sup>, Anailson de Oliveira Maciel<sup>1</sup>, Nayonara Silva de Almeida<sup>1</sup>, Nagylla Silva de Almeida<sup>1</sup>, Samira Santos Araujo<sup>1</sup>; Vanda Ferreira Ribeiro<sup>1</sup>, Jardson Guimarães Teixeira<sup>1</sup>, Izakiel Reis Marinho<sup>1</sup>, José Cássio Sousa dos Santos<sup>2</sup>, Thiago Santos Santos<sup>1</sup>, Zinaldo Firmino da Silva<sup>2</sup>, Nitalo Andre Farias Machado<sup>3</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal (LFRA), UFMA, Chapadinha, MA, Brasil

<sup>2</sup>Unidade de Pesquisa em Nutrição de Gado de Leite (UPNGL), UFMA, Chapadinha, MA, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório de Inovação e Tecnologia Rural, UFMA, Chapadinha, MA, Brasil

E-mail: yndyra.nayan@ufma.br

O sucesso na reprodução é dependente da temperatura, devido a sensibilidade das células reprodutivas aos efeitos do calor. Os danos provocados pela alta temperatura nos testículos são graves e de recuperação lenta, e acredita-se que o estresse oxidativo seja o principal gatilho, porque a alta temperatura promove a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência da temperatura ambiental, corporal e testicular, sobre os parâmetros de qualidade seminal em touros, mensurado através da câmera termográfica. Foram utilizados sete reprodutores, com idade média de 48 meses e peso vivo médio de 650kg. De cada animal foi colhido três ejaculados, através de eletroejaculação, para determinação da motilidade e da percentagem de patologias espermáticas (defeitos menores, maiores e totais) analisados em microscópio ótico. Os parâmetros seminais foram avaliados segundo o CBRA. As coletas foram realizadas no intervalo de 7 às 8 horas da manhã, seguidas pelas imagens que foram obtidas um total de 12 imagens por animal, 6 imagens corporais e 6 da região dos testículos, uma vez por semana, em três intervalos: antes, durante e após as coletas de sêmen. As imagens termográficas foram capturadas por uma câmera Fluke TiS10 (Fluke Systems®, Everett, WA, EUA). Todas as imagens foram adquiridas a uma distância de um metro dos animais. O ajuste do foco e a calibração dos parâmetros de temperatura e umidade relativa do local de coleta foram realizados automaticamente pelo equipamento, enquanto a emissividade foi configurada para 0,98, valor recomendado para tecidos biológicos. As imagens foram obtidas com resolução de 4800 pixels e armazenadas no formato Fluke .is2. A análise das imagens termográficas foi conduzida utilizando o software SmartView Classic 4.4® (Fluke Corporation®, Everett, WA, EUA). Foram observadas índice de temperatura de globo e umidade durante as coletas com média de  $79,53 \pm 1,46$ . Observou-se diferença ( $p < 0,05$ ) na temperatura corporal antes ( $34,11 \pm 0,77$ ), quando comparada as temperaturas corporais durante ( $35,58 \pm 0,93$ ), e após ( $35,47 \pm 0,82$ ) a coleta de sêmen nos touros, mas não foi verificada diferença ( $p > 0,05$ ) nas temperaturas testiculares ( $33,81 \pm 0,71$ ;  $34,38 \pm 0,63$  e  $34,01 \pm 1,36$ ), antes, durante e após a coleta, respectivamente. Os parâmetros seminais frescos apresentaram médias de (volume -  $5,47 \pm 0,99$ ; motilidade -  $86,66 \pm 1,26$ , vigor -  $3,5 \pm 0,22$ , e defeitos maiores -  $9,57 \pm 1,86$ ). Conclui-se que o aumento da temperatura corporal dos touros durante a coleta, não influenciou significativamente a temperatura testicular, como também não reduziu a qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Estresse térmico, sêmen, touro

## Testicular thermoregulation and its relationship with sperm quality in bulls

Carlos Eduardo Leandro Campos<sup>1</sup>, Nívia Maria Rocha Brandao<sup>1</sup>, Anailson de Oliveira Maciel<sup>1</sup>, Nayonara Silva de Almeida<sup>1</sup>, Nagylla Silva de Almeida<sup>1</sup>, Samira Santos Araujo<sup>1</sup>; Vanda Ferreira Ribeiro<sup>1</sup>, Jardson Guimarães Teixeira<sup>1</sup>, Izakiel Reis Marinho<sup>1</sup>, José Cássio Sousa dos Santos<sup>2</sup>, Thiago Santos Santos<sup>1</sup>, Zinaldo Firmino da Silva<sup>2</sup>, Nitalo Andre Farias Machado<sup>3</sup>, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Physiology and Reproduction (LFRA), UFMA, Chapadina, MA, Brazil

<sup>2</sup>Dairy Cattle Nutrition Research Unit (UPNGL), UFMA, Chapadina, MA, Brazil

<sup>3</sup>Rural Innovation and Technology Laboratory, UFMA, Chapadina, MA, Brazil

Email: yndyra.nayan@ufma.br

Successful reproduction is temperature-dependent, due to the sensitivity of reproductive cells to the effects of heat. The damage caused by high temperature to the testicles is severe and slow to recover, and oxidative stress is believed to be the main trigger, because high temperature promotes the production of reactive oxygen species (ROS). The aim of this study was to evaluate the influence of environmental, body and testicular temperature on seminal quality parameters in bulls, measured using a thermographic camera. Seven bulls were used, with an average age of 48 months and an average live weight of 650kg. Three ejaculates were collected from each animal via electroejaculation to determine motility and the percentage of sperm pathologies (minor, major and total defects) analyzed under an optical microscope. Seminal parameters were assessed according to the CBRA. Collections were carried out between 7 and 8 a.m., followed by imaging, which took a total of 12 images per animal, 6 body images and 6 of the testicular region, once a week, at three intervals: before, during and after semen collections. The thermographic images were captured by a Fluke TiS10 camera (Fluke Systems®, Everett, WA, USA). All images were acquired at a distance of one meter from the animals. The equipment automatically adjusted the focus and calibrated the temperature and relative humidity parameters of the collection site, while the emissivity was set to 0.98, the recommended value for biological tissues. The images were obtained with a resolution of 4800 pixels and stored in Fluke .is2 format. The thermographic images were analyzed using SmartView Classic 4.4® software (Fluke Corporation®, Everett, WA, USA). The globe temperature and humidity index was observed during collection, with an average of  $79.53 \pm 1.46$ . There was a difference ( $p < 0.05$ ) in body temperature before ( $34.11 \pm 0.77$ ), when compared to body temperatures during ( $35.58 \pm 0.93$ ), and after ( $35.47 \pm 0.82$ ) semen collection in the bulls, but there was no difference ( $p > 0.05$ ) in testicular temperatures ( $33.81 \pm 0.71$ ;  $34.38 \pm 0.63$  and  $34.01 \pm 1.36$ ), before, during and after collection, respectively. The fresh seminal parameters showed averages of (volume -  $5.47 \pm 0.99$ ; motility -  $86.66 \pm 1.26$ , vigor -  $3.5 \pm 0.22$ , and major defects -  $9.57 \pm 1.86$ ). It can be concluded that the increase in the bulls' body temperature during collection did not significantly influence testicular temperature, nor did it reduce sperm quality.

**Keywords:** Heat stress, semen, bull

## Achados clínicos, ultrassonográficos e anatomopatológicos da degeneração testicular idiopática em touro

Jéssica Priscila da Paz<sup>1</sup>; Denis Vinicius Bonato<sup>2</sup>; Antonio Campanha Martinez<sup>1</sup>; Rodrigo Garcia Motta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama – Paraná

<sup>2</sup>Universidade Paranaense, Umuarama - Paraná

Email: jessicaprisiladapz@gmail.com<sup>1</sup>, denisbonato@prof.unipar.br<sup>2</sup>, acmartinez@uem.br<sup>1</sup>, rgmotta2@uem.br<sup>1</sup>

A degeneração testicular consiste na perda da estrutura e função dos túbulos seminíferos, que reduz a concentração espermática, circunferência escrotal e aumento nas anormalidades morfológicas dos espermatozoides, impacta em subfertilidade ou infertilidade permanente nos reprodutores. Pode ser ocasionada por traumas, estresse (ambiental, térmico, nutricional), toxinas, enfermidades infecciosas e idiopáticas, com prognóstico ruim para atividade reprodutiva dos animais. O objetivo do presente estudo é descrever os achados clínicos, ultrassonográficos e anatomopatológicos de um caso de degeneração testicular idiopática em um touro. Realizou-se no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá, campus Umuarama, o atendimento de touro, jersolando, 4 anos de idade, escore de condição corporal 3,0, criado em condições extensivas, com histórico de assimetria testicular e dois exames andrológicos, em intervalos de 65 dias, demonstraram ejaculado com aspecto aquoso e azospermia. Durante o exame clínico, todos os parâmetros fisiológicos estavam dentro da normalidade (temperatura, tempo de preenchimento capilar, movimentos respiratórios, frequência cardíaca e motilidade ruminal). A avaliação do sistema reprodutivo evidenciou que os dois testículos, encontravam-se na bolsa escrotal, mobilidade reduzida, flacidez testicular bilateral, áreas de consistência friável intercaladas com regiões endurecidas e assimetria, com perímetro escrotal de 19,3 cm (sendo considerado perímetro escrotal, excelente acima de 35 cm e ruim abaixo de 26 cm). O segundo exame andrológico, confirmou ejaculado com aspecto aquoso, odor característico e pH 7,5, microscopicamente não foram identificados espermatozoides na amostra, confirmando a azoospermia. Realizou-se o exame ultrassonográfico com recurso Doppler, (*SonoScape S6 Vet*) frequência 16Mhz, probe linear, foram visibilizadas alterações no parênquima em ambos os testículos, os quais encontravam-se heterogêneos com áreas multifocais hiper ecogênicas dispostas em todo órgão. Dada a inaptidão reprodutiva, realizou-se a orquiectomia cirúrgica, a avaliação macroscópica dos testículos permitiu identificar focos esbranquiçados em torno do mediastino testicular, áreas de fibrose e áreas friáveis. Foram coletados e fixados em líquido de Bouin fragmentos dos testículos. O exame anatomopatológico identificou desorganização dos túbulos seminíferos, edema intersticial e perda da estratificação da linhagem germinativa, que se estendia por todo parênquima testicular avaliado. No interior dos túbulos presença de células soltas em picnose, não foram identificados células neoplásicas e focos de infecção bacteriana no parênquima testicular. Os achados clínicos, ultrassonográficos e anatomopatológicos confirmaram o diagnóstico de degeneração testicular idiopática, difusa, moderada em touro.

Palavras-chaves: andrologia, diagnóstico, patologia

## **Clinical, ultrasonographic and anatomopathological findings of idiopathic testicular degeneration in a bull**

*Achados clínicos, ultrassonográficos e anatomopatológicos da degeneração testicular idiopática em touro*

**Jéssica Priscila da Paz<sup>1</sup>; Denis Vinicius Bonato<sup>2</sup>; Antonio Campanha Martinez<sup>1</sup>; Rodrigo Garcia Motta<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama – Paraná

<sup>2</sup>Universidade Paranaense, Umuarama - Paraná

Email: jessicaprisiladapz@gmail.com<sup>1</sup>, denisbonato@prof.unipar.br<sup>2</sup>, acmartinez@uem.br<sup>1</sup>, rgmotta2@uem.br<sup>1</sup>

Testicular degeneration consists of the loss of structure and function of the seminiferous tubules, which reduces sperm concentration, scrotal circumference and an increase in morphological abnormalities of sperm, resulting in subfertility or permanent infertility in breeders. It can be caused by trauma, stress (environmental, thermal, nutritional), toxins, infectious and idiopathic diseases, with a poor prognosis for the reproductive activity of animals. The objective of the present study is to describe the clinical, ultrasonographic and anatomopathological findings of a case of idiopathic testicular degeneration in a bull. The treatment of a bull, Jersolando, 4 years old, body condition score 3.0, raised in extensive conditions, with a history of testicular asymmetry and two andrological examinations, was carried out at the Veterinary Hospital of the State University of Maringá, Umuarama campus. at intervals of 65 days, they demonstrated ejaculate with a watery appearance and azospermia. During the clinical examination, all physiological parameters were within normal limits (temperature, capillary refill time, respiratory movements, heart rate and rumen motility). The evaluation of the reproductive system showed that the two testicles were in the scrotum, reduced mobility, bilateral testicular flaccidity, areas of friable consistency interspersed with hardened regions and asymmetry, with a scrotal perimeter of 19.3 cm (scrotal perimeter being considered excellent above 35 cm and poor below 26 cm). The second andrological examination confirmed ejaculate with a watery appearance, characteristic odor and pH 7.5. Microscopically, no sperm were identified in the sample, confirming azoospermia. An ultrasound examination was performed using Doppler, (SonoScape S6 Vet) frequency 16Mhz, linear probe, changes in the parenchyma were visible in both testicles, which were heterogeneous with multifocal hyper echogenic areas located throughout the organ. Given the reproductive inability, surgical orchiectomy was performed, macroscopic evaluation of the testicles allowed the identification of whitish foci around the testicular mediastinum, areas of fibrosis and friable areas. Fragments of the testicles were collected and fixed in Bouin's fluid. The pathological examination identified disorganization of the seminiferous tubules, interstitial edema and loss of germline stratification, which extends throughout the entire testicular parenchyma evaluated. There were loose cells in pyknosis inside the tubules, no neoplastic cells and no foci of bacterial infection were identified in the testicular parenchyma. Clinical, ultrasonographic and anatomopathological findings confirmed the diagnosis of idiopathic, diffuse, moderate testicular degeneration in bull.

**Keywords:** andrology, diagnostic, pathology

## **Análise da temperatura testicular com o uso da termografia por infravermelho em bovinos Nelore criados na região Oeste do Pará**

**Yasmin Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, Maria Eduarda Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, Aline Pacheco<sup>1</sup>, Kedson Alessandri Lobo Neves<sup>1</sup>, Erick Davi Figueiredo Lemos<sup>1</sup>, Clender Freitas Araújo<sup>1</sup>, Yana Eliza Feitosa de Almeida<sup>1</sup>, Wilton dos Santos Marinho<sup>1</sup>, William Carvalho de Souza<sup>1</sup>, Charlane Karollaine de Castro Dourado<sup>1</sup>, Ketlen Jaiane Farias Monteiro<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Santarém Pará  
\*e-mail:yasminpompeuyasmin@gmail.com

A raça Nelore tornou-se relevante para produção em regiões tropicais caracterizados pela prevalência de sistemas extensivos a pasto devido a sua adaptabilidade a ambientes rústicos. No entanto, temperaturas elevadas causam estresse térmico nos animais reduzindo diretamente ou indiretamente a sua eficiência reprodutiva, afetando a qualidade seminal, os níveis hormonais e o comportamento reprodutivo de touros. Dessa forma a termografia digital por infravermelho surge como uma técnica não invasiva utilizada para detectar alterações nos padrões de temperatura testicular de bovinos. O objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade do uso da termografia testicular como ferramenta eficaz na avaliação de bem-estar e estresse térmico em bovinos Nelore. Para este fim, a câmera termográfica por Infravermelho (FLIR E-40®, Resolução 3.1 megapixel) foi utilizada para determinar a temperatura superficial do testículo sendo posicionada a um metro de distância para a confecção da imagem de termografia por infravermelho. Foi realizada 4 coletas sendo 2 no mês de setembro, 1 em outubro e 1 em novembro, nos horários de 9:00 as 12:00 da manhã. As imagens geradas foram analisadas pelo software a partir de 5 pontos específicos, sendo eles: (T1) cordões espermáticos, (T2) ponto dorsal do testículo, (T3) ponto médio do testículo, (T4) ponto ventral do testículo, (T5) cauda do epidídimo em cada um dos testículos. Os dados foram avaliados pela análise de variância no software RStudio, e posteriormente aplicou-se o teste de Tukey a 5%. Para as temperaturas médias da coleta 3 e 4 (37,73°C e 36,64 °C) não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para as temperaturas do cordão espermático, ponto médio, ponto dorsal, ponto ventral e epidídimo, indicando uma boa termorregulação escrotal dos animais nos dias dessas coletas. Porém, ao comparar as coletas, observou-se que a coleta 1 (34,68 °C) diferenciou-se ( $P<0,05$ ) da coleta 2 (38,68 °C) em todas as aferições de temperatura escrotal, sendo que na coleta 2 as temperaturas foram superiores, o que supostamente pode ser explicado pelo marco do início do verão na coleta 1 (01/09/2023) e do verão na coleta 2 (29/09/2023). Os resultados do estudo revelaram diferenças de temperatura com destaque na coleta 2, o que demonstrou um comportamento térmico testicular significativamente mais alto. Essa observação suscita a hipótese de que esses animais estavam demonstrando termorregulação com faixas decrescentes de temperatura do cordão espermático em relação ao testículo e ao epidídimo. A termografia pode ser uma ferramenta importante para detectar variações de temperatura superficial nos testículos dos animais e relacionar com o estresse térmico e bem-estar nos bovinos.

**Palavras-chave:** Bem-estar, estresse térmico, termografia por infravermelho, termografia escrotal.

**Agradecimentos:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA)

## Analysis of testicular temperature using infrared thermography in Nelore cattle raised in the Western region of Pará

Yasmin Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, Maria Eduarda Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, Aline Pacheco<sup>1</sup>, Kedson Alessandri Lobo Neves<sup>1</sup>, Erick Davi Figueiredo Lemos<sup>1</sup>, Clender Freitas Araújo<sup>1</sup>, Yana Eliza Feitosa de Almeida<sup>1</sup>, Wilton dos Santos Marinho<sup>1</sup>, William Carvalho de Souza<sup>1</sup>, Charlane Karollaine de Castro Dourado<sup>1</sup>, Ketlen Jaiane Farias Monteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Western Pará/UFOPA, Santarém Pará  
\*e-mail: yasminpompeuyasmin@gmail.com

The Nelore breed has become relevant for production in tropical regions characterized by the prevalence of extensive pasture systems due to its adaptability to rustic environments. However, high temperatures cause thermal stress in animals, directly or indirectly reducing their reproductive efficiency, affecting seminal quality, hormone levels, and bull reproductive behavior. Thus, digital infrared thermography emerges as a non-invasive technique used to detect changes in testicular temperature patterns in cattle. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of using testicular thermography as an effective tool in assessing welfare and thermal stress in Nelore cattle. For this purpose, the Infrared Thermal Camera (FLIR E-40<sup>®</sup>, 3.1 megapixel resolution) was used to determine the surface temperature of the testicle, positioned at 1m distance for the construction of the infrared thermography image divided into 4 collections on different days in the months of september and november. From 9:00 a.m. to 12:00 p.m. The images were analyzed by the software from 5 specific points: (T1) spermatic cords, (T2) dorsal point of the testicle, (T3) midpoint of the testicle, (T4) ventral point of the testicle, (T5) tail of the epididymis in each of the testicles. Data were evaluated by analysis of variance in RStudio software, and subsequently the Tukey test was applied at 5%. For temperatures of collections 3 and 4 (37,73 and 36,64), there was no difference ( $P>0.05$ ) for temperatures of the spermatic cord, midpoint, dorsal point, ventral point, and epididymis, indicating good scrotal thermoregulation of the animals on the days of these collections. However, when comparing collections, collection 1 (34,68) differed ( $P<0.05$ ) from collection 2 (38,68) in all scrotal temperature measurements, with higher temperatures in collection 2, which may be explained by the beginning of summer in collection 1 (september 1st, 2023) and summer in collection 2 (september 29th, 2023). The study results revealed temperature differences, particularly in collection 2, which showed significantly higher testicular thermal behavior. This observation raises the hypothesis that these animals were demonstrating thermoregulation with decreasing temperature ranges of the spermatic cord in relation to the testicle and epididymis. Thermography can be an important tool for detecting variations in surface temperature in the testicles of animals and relating them to thermal stress and welfare in cattle.

**Keywords:** Infrared Thermography; Welfare; Thermal Stress; Scrotal Thermogram; Nelore

**Acknowledgments:** To the State of Pará Research Foundation (FAPESPA)

## Influência do efeito climático na morfologia espermática de touros Mestiços criados na Amazônia Oriental – resultados preliminares

Charlene Karollaine de Castro Dourado<sup>1</sup>, Maria Eduarda Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, Aline Pacheco<sup>1</sup>, Kedson Alessandri Lobo Neves<sup>1</sup>, Erick Davi Figueiredo Lemos<sup>1</sup>, Yana Eliza Feitosa de Almeida<sup>1</sup>, Clender Freitas Araújo<sup>1</sup>, Wilton dos Santos Marinho<sup>1</sup>, Yasmin Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, William Carvalho de Souza<sup>1</sup>, Ketlen Jaiane Farias Monteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Santarém Pará  
\*e-mail: charlenekarollaine@gmail.com

O clima da Amazônia Oriental é caracterizado por altas temperaturas e alta umidade, o que pode ter efeitos significativos sobre a fisiologia dos animais, incluindo a produção e a qualidade do espermatozoide e, indiretamente, na testicular. A identificação das anormalidades morfológicas reflete na funcionalidade do espermatozoide e, indiretamente, na testicular. A identificação das prováveis causas de queda na qualidade espermática é importante para a seleção de reprodutores e adequação de protocolos reprodutivos. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do clima amazônico na qualidade morfológica do sêmen de touros. Foram utilizados 15 touros mestiços com idade média de 854 dias para avaliação do sêmen. Os animais permaneceram sob pastejo (*Brachiaria brizantha* CV. marandu), suplementados com sal mineral e água *ad libitum* e sem acesso a sombra. Todos os 15 animais passaram por coletas de sêmen, realizadas com auxílio do aparelho eletroejaculador Boijektor- 2001<sup>®</sup>, durante os meses de agosto, setembro e outubro de 2023. Estes são os meses mais quentes do ano na região Amazônica e o ano 2023 foi marcado pela presença de forte efeito climático *El niño* com período menos chuvoso muito acentuado. Cada touro foi contido individualmente, e a técnica de eletroestimulação aplicada até a obtenção do ejaculado. A coleta foi realizada em tubos graduados e aquecidos a 37°C para evitar choque térmico, e protegidos da luz. Para as avaliações da morfologia espermática foram adicionadas à solução de formol-citrato uma fração do ejaculado até a turvação do meio, posteriormente encaminhadas para Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, para as análises das anormalidades espermáticas. As amostras foram coradas com rosa bengala e analisadas em microscopia óptica de campo claro (Zeiss<sup>®</sup>) com aumento de 1000x. A quantidade de defeitos foi tabulada em planilha do excel, sendo classificados em defeitos maiores, menores e totais, de acordo com Blom (1973). Foi realizada uma análise descritiva no próprio excel. Foram encontrados uma média  $\pm$  desvio padrão de 14,87  $\pm$  16,98 para defeitos maiores, 15,24  $\pm$  11,04 para defeitos menores e 28,67  $\pm$  42,43 para defeitos. Dentre os defeitos menores os mais frequentes foram: Cauda dobrada (média = 8,79  $\pm$  8,48, valor máximo 37 e mínimo 0), Decaptado (média = 5,89  $\pm$  10,68, valor máximo 50 e mínimo 1), Gota citoplasmática distal (média = 3,5  $\pm$  4,55, valor máximo 17 e mínimo 1) e Delgado (média = 3,4  $\pm$  2,33, valor máximo 11 e mínimo 0). Defeitos relacionados principalmente a estresse térmico, choque térmico e incompleto desenvolvimento epididimal. Já os defeitos maiores, que estão correlacionados com prejuízos de fertilidade ou com uma condição patológica do testículo ou epidídimo, os mais frequentes foram: Gota Citoplasmática Proximal (média = 6,44  $\pm$  12,19, valor máximo 87 e mínimo 0), Cauda fortemente dobrada (média = 4,98  $\pm$  4,0, valor máximo 27 e mínimo 1) e Cauda fortemente enrolada (média = 3,48  $\pm$  4,93 valor máximo 19 e mínimo 1). Essas anormalidades estão diretamente relacionadas ao estresse térmico demonstrando que o calor pode afetar a qualidade espermática e devido a grande variação entre os animais observa-se que alguns touros podem ser mais sensíveis que outros. Os resultados preliminares obtidos demonstram que a quantidade de patologias espermáticas pode ser afetada pelo estresse calórico, no entanto é necessário ainda resultados dos períodos mais amenos do ano, para confirmação.

**Palavra-chave:** Estresse térmico, calor, fertilidade, qualidade espermática.

**Agradecimentos:** À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA)

## Influence of climatic effects on the sperm morphology of crossbred bulls raised in the Eastern Amazon - preliminary results

Charlene Karollaine de Castro Dourado<sup>1</sup>, Maria Eduarda Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, Aline Pacheco<sup>1</sup>, Kedson Alessandri Lobo Neves<sup>1</sup>, Erick Davi Figueiredo Lemos<sup>1</sup>, Yana Eliza Feitosa de Almeida<sup>1</sup>, Clender Freitas Araújo<sup>1</sup>, Wilton dos Santos Marinho<sup>1</sup>, Yasmin Pompeu de Macedo<sup>1</sup>, William Carvalho de Souza<sup>1</sup>, Ketlen Jaiane Farias Monteiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Western Pará /UFOPA, Santarém Pará.

\*e-mail: charlenekarollaine@gmail.com

The climate of the Eastern Amazon is characterized by high temperatures and high humidity, which can have significant effects on the physiology of animals, including sperm production and quality. Identifying morphological abnormalities reflects on sperm functionality and indirectly on the testicles. Identifying probable causes of decreased sperm quality is important for selecting breeders and adapting reproductive protocols. The aim of this study was to evaluate the influence of the Amazon climate on the morphological quality of bull semen. Fifteen crossbred bulls with an average age of 854 days were used for semen evaluation. The animals remained under grazing (*Brachiaria brizantha* CV. marandu), supplemented with mineral salt and ad libitum water without access to shade. All 15 animals underwent semen collection using the Boijektor-2001® electroejaculator device during the months of August, September, and October 2023. These are the hottest months of the year in the Amazon region, and the year 2023 was marked by the presence of a strong El Niño climatic effect with a very pronounced less rainy period. Each bull was individually restrained, and electrostimulation was applied until ejaculate was obtained. Collection was performed in graduated and heated tubes at 37°C to avoid thermal shock and protected from light. For sperm morphology evaluations, a fraction of the ejaculate was added to a formalin-citrate solution until the medium became turbid, then sent to the Animal Reproduction Biotechnology Laboratory for analysis of sperm abnormalities. Samples were stained with rose bengal and analyzed under bright-field optical microscopy (Zeiss®) at 1000x magnification. The number of defects was tabulated in an Excel spreadsheet, classified into major, minor, and total defects according to Blom (1973). A descriptive analysis was performed in Excel itself. A mean  $\pm$  standard deviation of  $14.87 \pm 16.98$  was found for major defects,  $15.24 \pm 11.04$  for minor defects, and  $28.67 \pm 42.43$  for total defects. Among the minor defects, the most frequent were: Bent tail (average =  $8.79 \pm 8.48$ , maximum value 37, minimum 0), Decapitated (average =  $5.89 \pm 10.68$ , maximum value 50, minimum 1), Distal cytoplasmic droplet (average =  $3.5 \pm 4.55$ , maximum value 17, minimum 1), and Thin (average =  $3.4 \pm 2.33$ , maximum value 11, minimum 0). Defects mainly related to thermal stress, thermal shock, and incomplete epididymal development. As for major defects, which are correlated with fertility impairments or pathological conditions of the testicle or epididymis, the most frequent were: Proximal cytoplasmic droplet (average =  $6.44 \pm 12.19$ , maximum value 87, minimum 0), Strongly bent tail (average =  $4.98 \pm 4.0$ , maximum value 27, minimum 1), and Strongly coiled tail (average =  $3.48 \pm 4.93$ , maximum value 19, minimum 1). These abnormalities are directly related to thermal stress, demonstrating that heat can affect sperm quality, and due to the significant variation among animals, it is observed that some bulls may be more sensitive than others. The preliminary results obtained demonstrate that the quantity of sperm pathologies may be affected by heat stress; however, results from milder periods of the year are still needed for confirmation.

**Keywords:** Thermal stress, heat, fertility, sperm quality.

**Acknowledgments:** To the State of Pará Research Foundation (FAPESPA)



## Differences in testicular biometrics of prepubertal Nelore and Canchim bulls

Giovanna Galhardo Ramos<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>1</sup>, Joedson Dantas Gonçalves<sup>2</sup>, Alda Juliana Castro de Sousa<sup>3</sup>, Gabriela Novais Azevedo<sup>4</sup>, Vinicius Rosendo Piloto<sup>4</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Gabriel Brum Vergani<sup>2</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Pará (UFPA), Rua Augusto Corrêa, 01, CEP 66073-044, Belém, PA, Brasil.

<sup>4</sup>Bolsista de Treinamento Técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

<sup>5</sup>Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil.  
E-mail: giovannagalhardo@usp.br

Measuring testicular biometrics at weaning can be a valuable tool for pre-selecting bulls, as larger scrotal circumference measurements are associated with early puberty. It is known that there are differences in testicular anatomy between Zebu, taurus and composite animals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the development of testicular biometry in prepubertal animals of the Nelore and Canchim breeds from 7 to 12 months of age. Forty-eight animals were used, 24 Nelore (*Bos indicus*) and 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), with a mean age of  $7.7 \pm 0.5$  months, a body weight of  $200.5 \pm 22.2$  kg, and a body condition score of 5.0 (scale 1-9). The animals were maintained in an intensive rotational grazing system with *Urochloa brizantha* (cv Piatã), with ad libitum access to a mineral mix and water trough. The evaluations were carried out with the animals in a chute, without prior sedation, once a month for six months. Measurements were taken with a metal caliper (mm) to determine the width and length of the testes bilaterally. A graduated tape measure (mm) was used to determine the scrotal circumference in the region of the largest scrotal diameter. Comparisons were made between breed (Nelore vs. Canchim), age (7, 8, 9, 10, 11 and 12 months) and their possible interactions. The data were subjected to a normality test (Shapiro-Wilk) and then to an analysis of variance (ANOVA). The data were evaluated in repeated measures over time using SAS (Statistical Analysis System) software, with a significance level of 5% ( $P < 0.05$ ). There was a significant difference in testicular length for breed ( $P = 0.002$ ), with Canchim animals ( $12.04 \pm 0.12^a$  cm) showing higher values than Nelore animals ( $11.16 \pm 0.11^b$  cm). There was also a significant effect of age on testicular length: 7 ( $10.14 \pm 0.4^a$  cm), 8 ( $10.85 \pm 0.17^d$  cm), 9 ( $11.39 \pm 0.16^{cd}$  cm), 10 ( $11.82 \pm 0.18^{bc}$  cm), 11 ( $12.37 \pm 0.18^b$  cm) and 12 months ( $13.15 \pm 0.18^a$  cm), with progressive growth with advancing age, regardless of breed ( $P < 0.0001$ ). There was no interaction between breed and age for testicular length ( $P = 0.20$ ). There was also a significant difference for testicular width ( $P < 0.0001$ ), with higher values for Canchim animals ( $6.52 \pm 0.06^a$  cm) compared to Nelore ( $5.86 \pm 0.05^b$  cm). The bulls' age determined significant differences: 7 ( $5.67 \pm 0.08^d$  cm), 8 ( $6.01 \pm 0.07^{cd}$  cm), 9 ( $6.12 \pm 0.09^c$  cm), 10 ( $6.23 \pm 0.10^{bc}$  cm), 11 ( $6.48 \pm 0.11^{ab}$  cm) e 12 months ( $6.71 \pm 0.11^a$  cm), with progressive growth in testicular width, regardless of breed ( $P < 0.0001$ ). There was an interaction between breed and age for testicular width ( $P = 0.01$ ). Scrotal circumference showed a significant difference ( $P = 0.0007$ ), with mean values for the Canchim breed ( $22.69 \pm 0.19^a$  cm<sup>2</sup>) compared to the Nelore breed ( $21.04 \pm 0.13^b$  cm<sup>2</sup>). There was a significant difference between the ages: 7 ( $20.43 \pm 0.22^d$  cm<sup>2</sup>), 8 ( $21.06 \pm 0.22^{cd}$  cm<sup>2</sup>), 9 ( $21.66 \pm 0.25^{bc}$  cm<sup>2</sup>), 10 ( $22.06 \pm 0.03^{bc}$  cm<sup>2</sup>), 11 ( $22.62 \pm 0.32^{ab}$  cm<sup>2</sup>) e 12 months ( $23.59 \pm 0.34^a$  cm<sup>2</sup>), with progressive growth over the months, regardless of breed ( $P < 0.0001$ ). There was an interaction between breed and age for scrotal circumference ( $P < 0.001$ ). In conclusion, prepubertal animals of the Canchim breed have superior scrotal-testicular biometrics compared to their counterparts of the Nelore breed.

**Keywords:** Animal Andrology; Selection; Testicular morphology; Puberty; Beef cattle.

## Diferenças na biometria testicular de animais pré-púberes Nelore e Canchim

Giovanna Galhardo Ramos<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>1</sup>, Joedson Dantas Gonçalves<sup>2</sup>, Alda Juliana Castro de Sousa<sup>3</sup>, Gabriela Novais Azevedo<sup>4</sup>, Vinicius Rosendo Piloto<sup>4</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Gabriel Brum Vergani<sup>2</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal do Pará (UFPA), Rua Augusto Corrêa, 01, CEP 66073-044, Belém, PA, Brasil.

<sup>4</sup>Bolsista de Treinamento Técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

<sup>5</sup>Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil.  
E-mail: giovannagalhardo@usp.br

A mensuração de biometrias testiculares a partir da desmama pode ser uma ferramenta de pré-seleção de touros, pois medidas maiores de perímetro escrotal estão associadas à puberdade precoce. Sabe-se que existem diferenças na anatomia testicular entre animais zebuínos, taurinos e compostos. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a evolução da biometria testicular de animais pré-púberes das raças Nelore e Canchim, dos 7 aos 12 meses de idade. Foram usados 48 animais, sendo 24 Nelore (*Bos indicus*) e 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), com idade média de 7,7±0,5 meses, 200,5±22,2 kg de peso vivo e escore de condição corporal 5,0 (escala 1-9). Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado intensivo de *Urochloa brizantha* (cv Piatã) com acesso *ad libitum* a mistura mineral e água. As avaliações foram realizadas com os animais contidos em brete, em estação, sem uso de sêdação prévia, uma vez ao mês, durante 6 meses. As mensurações foram realizadas com paquímetro metálico (mm) para determinar bilateralmente a largura e o comprimento dos testículos. Foi usada fita maleável graduada (mm) para determinação do perímetro escrotal, na região de maior diâmetro do escroto. Foram realizadas comparações entre raça (Nelore vs Canchim), idade (7, 8, 9, 10, 11 e 12 meses) e suas possíveis interações. Os dados foram submetidos à avaliação de normalidade (Shapiro Wilk) e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA). Os dados foram avaliados em medidas repetidas no tempo utilizando o software SAS (Statistical Analysis System), com nível de significância de 5% (P<0,05). Houve diferença significativa quanto ao comprimento testicular para raça (P=0,002), sendo que animais Canchim (12,04 ± 0,12<sup>a</sup> cm) apresentaram valores superiores aos animais Nelore (11,16 ± 0,11<sup>b</sup> cm). Também houve efeito significativo da idade no comprimento testicular: 7 (10,14 ± 0,14<sup>c</sup> cm), 8 (10,85 ± 0,17<sup>d</sup> cm), 9 (11,39 ± 0,16<sup>cd</sup> cm), 10 (11,82 ± 0,18<sup>bc</sup> cm), 11 (12,37 ± 0,18<sup>b</sup> cm) e 12 meses (13,15 ± 0,18<sup>a</sup> cm), com crescimento progressivo com o avançar da idade, independente da raça (P<0,0001). Não houve interação entre raça e idade para o comprimento testicular (P=0,20). Também houve diferença significativa para largura testicular (P<0,0001), com maiores valores para animais Canchim (6,52 ± 0,06<sup>a</sup> cm) em relação aos Nelore (5,86 ± 0,05<sup>b</sup> cm). A idade determinou diferenças significativas: 7 (5,67 ± 0,08<sup>d</sup> cm), 8 (6,01 ± 0,07<sup>cd</sup> cm), 9 (6,12 ± 0,09<sup>c</sup> cm), 10 (6,23 ± 0,10<sup>bc</sup> cm), 11 (6,48 ± 0,11<sup>ab</sup> cm) e 12 meses (6,71 ± 0,11<sup>a</sup> cm), com crescimento progressivo da largura testicular, independente da raça (P<0,0001). Houve interação entre raças e idade para largura testicular (P=0,01). O perímetro escrotal apresentou diferença significativa (P=0,0007), com valores médios para a raça Canchim (22,69 ± 0,19<sup>a</sup> cm<sup>2</sup>) em relação à raça Nelore (21,04 ± 0,13<sup>b</sup> cm<sup>2</sup>). Houve diferença significativa entre as idades: 7 (20,43 ± 0,22<sup>d</sup> cm<sup>2</sup>), 8 (21,06 ± 0,22<sup>cd</sup> cm<sup>2</sup>), 9 (21,66 ± 0,25<sup>bc</sup> cm<sup>2</sup>), 10 (22,06 ± 0,03<sup>bc</sup> cm<sup>2</sup>), 11 (22,62 ± 0,32<sup>ab</sup> cm<sup>2</sup>) e 12 meses (23,59 ± 0,34<sup>a</sup> cm<sup>2</sup>), com crescimento progressivo com o passar dos meses, independente da raça (P<0,0001). Houve interação entre raça e idade para o perímetro escrotal (P<0,001). Em conclusão, os animais pré-púberes da raça Canchim apresentam biometrias escroto-testiculares superiores quando comparados aos contemporâneos da raça Nelore.

**Palavras-chave:** Andrologia Animal; Seleção; Morfologia testicular; Puberdade; Bovinos de corte.

## Sêmen congelado acrescido de extrato natural: Cinética espermática e taxas de gestação após IATF – Resultados Parciais

Camila Keterine Gorzelanski Trenkel<sup>1\*</sup>; Adalgiza Pinto Neto<sup>1,2</sup>; Gabriela Gonçalves Fagundes<sup>2</sup>; Eduardo Crestani Gonçalves<sup>2</sup>; João Vitor Pchimer<sup>2</sup>; André Marcos Dezen Bieniek<sup>2</sup>; Jaqueline Zanella<sup>2</sup>; Antonio Campanha Martinez<sup>3</sup>; Dalila Moter Benvegna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza, Paraná\*; <sup>2</sup>Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Realeza, Paraná. <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Universidade Estadual de Maringá, UEM, *Campus* Umuarama, Paraná.

\*E-mail: catrenkel@gmail.com

A criopreservação espermática permite um rápido avanço genético em rebanhos comerciais, especialmente bovinos, devido a sua utilização em biotecnias reprodutivas como a Inseminação Artificial (IA), Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e Produção *in vitro* de Embriões (PIV). Estudos sobre a sincronização do estro e ovulação das fêmeas bovinas têm sido desenvolvidos, buscando otimizar as taxas de gestação em programas de IATF, no entanto, a qualidade do sêmen utilizado é essencial para garantir o resultado desejado. O processo de criopreservação provoca danos celulares que resultam na diminuição considerável no número de espermatozoides que resistem ao processo de congelamento/descongelamento, perdendo sua viabilidade. Esses danos são causados por diferentes fatores, entre eles a formação excessiva de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) na membrana espermática, em virtude da maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados, associada a quantidades insuficientes de enzimas citoplasmáticas com função antioxidante, aumentando assim a predisposição aos danos celulares que podem resultar em morte espermática. Sendo assim, a utilização de aditivos antioxidantes no sêmen pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos das EROs, otimizando a qualidade do sêmen criopreservado, com consequente melhoria nas taxas de gestação após a utilização em programas de IATF nos rebanhos bovinos. O estudo, objetivou avaliar a cinética espermática e as taxas de gestação de vacas submetidas ao protocolo de IATF, utilizando sêmen congelado acrescido de um extrato natural oriundo de uma nogueira (*Carya illinoensis*) de Potencial Antioxidante (NP). Sendo assim, foram coletadas 9 amostras de sêmen de um único touro da raça Braford, utilizando eletroejaculador em intervalo semanal. As amostras foram submetidas a avaliação pré-congelamento em Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (CASA; IVOS-II<sup>®</sup>, Hamilton Thorne) para certificação da viabilidade espermática, e então diluídas em Tris-hidroximetil-aminometano e gema de ovo, acrescidas de um extrato natural com Potencial Antioxidante (NP) de acordo com o grupo. Cada ejaculado foi dividido em 4 grupos experimentais: Grupo 1: Controle, apenas diluente; Grupo 2: Diluente mais 0,5% de NP; Grupo 3: Diluente mais 0,75% de NP; e o Grupo 4: 1% de NP. Foram envasadas, manualmente, 20 palhetas de sêmen por grupo experimental (palhetas de 0,25ml, com concentração média de  $11 \times 10^6$  espermatozoides viáveis por dose). Para o congelamento, as palhetas foram resfriadas por 4 horas (caixas térmicas Botuflex<sup>®</sup>), e posteriormente submetidas ao congelamento em vapor de nitrogênio líquido por 12 minutos, e então imersas em nitrogênio à temperatura de -196°C. No mínimo uma semana após ao congelamento, duas palhetas de cada grupo foram descongeladas (37°C/30 segundos), e submetidas a avaliação da qualidade espermática pelo sistema CASA. Para avaliar a taxa de gestação, 68 fêmeas bovinas mestiças foram submetidas a IATF, utilizando sêmen criopreservado dos diferentes grupos experimentais divididos aleatoriamente. 45 dias após IATF realizou-se o diagnóstico de gestação por ultrassonografia. Os resultados da motilidade espermática mostraram que nos grupos suplementados com NP, não houve diferença significativa na motilidade total (%), motilidade progressiva (%), espermatozoides estáticos (%) e lentos (%) ( $p > 0,05$ ). Em relação a cinemática espermática, foram avaliadas as variáveis de Velocidade média da trajetória (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Linear (VSL), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR) e Oscilação (WOB) do movimento espermático, sendo os valores semelhantes entre os Grupos suplementados com NP ( $p > 0,05$ ), porém inferior ao Grupo Controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados revelaram aumento nos defeitos morfológicos (gota citoplasmática proximal, cauda dobrada e enrolada) no sêmen do Grupo Controle, quando comparado ao sêmen fresco, sem diferença significativa em relação aos grupos suplementados. No entanto, o Grupo 4 apresentou maior porcentagem de defeitos na peça intermediária que os demais Grupos ( $p < 0,05$ ), que foram semelhantes entre si. Em relação à taxa de gestação, os resultados parciais descritivos indicaram 70,59% (12/17), 77,78% (14/18), 50,00% (08/16) e 70,59% (12/17) nos Grupos 1 (Controle), 2, 3 e 4, respectivamente. Os dados parciais do presente estudo indicam que a adição do extrato natural com capacidade antioxidante no diluente de sêmen submetido a criopreservação não influenciou os parâmetros da cinética espermática e/ou taxa de gestação.

**Palavras-chave:** Antioxidantes, criopreservação, viabilidade seminal, eficiência reprodutiva.

## Frozen semen with addition of a natural extract: Sperm kinetics and pregnancy rates after FTAI – Partial Results

Camila Keterine Gorzelanski Trenkel<sup>1\*</sup>; Adalgiza Pinto Neto<sup>1,2</sup>; Gabriela Gonçalves Fagundes<sup>2</sup>; Eduardo Crestani Gonçalves<sup>2</sup>; João Vitor Pchimer<sup>2</sup>; André Marcos Dezen Bieniek<sup>2</sup>; Jaqueline Zanella<sup>2</sup>; Antonio Campanha Martinez<sup>3</sup>; Dalila Moter Benvegna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduate Program in Livestock Health and Welfare and Sustainable Livestock Production at the Federal University of Fronteira Sul, Realeza Campus, Realeza, Paraná, Brazil\*; <sup>2</sup>Veterinary Medicine Course, Federal University of Fronteira Sul, Realeza Campus, Realeza, Paraná, Brazil. <sup>3</sup>Graduate Program in Sustainable Livestock Production and Livestock Health at the State University of Maringá (UEM), Umuarama Campus, Paraná, Brazil.

\*E-mail: catrenkel@gmail.com

Sperm cryopreservation allows rapid genetic advancement in commercial herds, especially cattle, by using frozen semen in artificial insemination programs, Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) and *in vitro* Embryo Production (IVEP). Studies have been developed on the synchronization of estrus and ovulation in bovine females, seeking to optimize pregnancy rates in FTAI programs, without, however, highlighting the quality of the semen used, which is essential to guarantee the desired result. The cryopreservation process causes cellular damage which results in a considerable reduction in the number of spermatozoa which can resist the freezing and thawing process, losing their viability. This damage is caused by Reactive Oxygen Species (ROS) in the sperm membrane, due to the higher concentration of polyunsaturated fatty acids, associated with insufficient amounts of cytoplasmic enzymes with antioxidant function to neutralize excess ROS, thus increasing the predisposition to cellular damage which can result in sperm death. Therefore, the assessment of the use of antioxidant additives in semen proves to be a relevant tool in blocking ROS, optimizing the quality of cryopreserved semen, with a consequent improvement in pregnancy rates after use in FTAI programs for cattle herds. The objective of this study was to evaluate the sperm kinetics and pregnancy rates of cows submitted to the FTAI protocol, using frozen semen plus a natural extract from a walnut tree (*Carya illinoensis*) with Non-Oxidizing Potential (NP). To this end, 9 semen samples (electroejaculation – weekly interval) from a Braford sire were subjected to fresh evaluation in a Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) system (IVOS-II<sup>®</sup>, Hamilton Thorne) to certify sperm viability, diluted in Tris-hydroxymethyl-aminomethane and egg yolk, with the addition of a natural extract with Non-Oxidizing Potential (NP) to the diluting medium, divided into the following experimental groups: Group 1: Control Group: semen diluted with 0% NP; Group 2: Semen diluted with 0.5% NP; Group 3: Semen diluted with 0.75% NP; and Group 4: Semen diluted with 1% NP. The semen from each experimental group was manually filled into 0.25 ml straws (average dose of  $11 \times 10^6$  viable spermatozoa per straw), with 20 straws being filled per experimental group, totaling 80 frozen straws per sample. For freezing, the straws were cooled for 4 hours (BotuFlex<sup>®</sup> thermal boxes). After opening the boxes, the straws were subjected to pre-freezing in liquid nitrogen vapor for 12 minutes, and immersed in nitrogen at a temperature of -196°C. After at least 1 week of freezing, two straws from each experimental group were thawed (37°C/30 seconds), homogenized in Eppendorf tubes and subjected to evaluation by the CASA system, while 68 crossbred bovine females were subjected to FTAI after synchronization of estrus and ovulation, using randomly chosen doses of frozen semen from different experimental groups. 45 days after FTAI, pregnancy was diagnosed by ultrasound, and the female was considered pregnant when the presence of an embryonic vesicle with an embryo and/or fetal heartbeat was verified. In semen added with different concentrations of NP, it was observed that the following seminal motility parameters: total sperm motility (%), progressive sperm motility (%), static (%) and slow (%) spermatozoa were similar among the groups ( $p > 0.05$ ) and lower than those observed in fresh semen ( $p < 0.05$ ). Sperm velocity and trajectory, measured by the variables VAP (Velocity in an Average Path), VCL (Velocity in a Curved Line) and VSL (Velocity in a Straight Line, between two points on the path), and by the variables LIN (Linearity), STR (Straightness) and WOB (Wobble) of sperm movement, respectively, were also similar among the Groups that had NP added to the semen extender ( $p > 0.05$ ), and lower than the Control Group ( $p < 0.05$ ). The freezing/thawing process led to sperm damage, observed by increased morphological changes (proximal and distal cytoplasmic droplets, bent and curled tail) in thawed Control Group semen, when compared to fresh semen ( $p < 0.05$ ), with no variation in the percentage of these changes when adding NP to the semen extender, as observed in Groups 2, 3 and 4 ( $p > 0.05$ ). However, a higher percentage of defects in the middle piece was observed in spermatozoa from Group 4 semen compared to the other Groups ( $p < 0.05$ ), which presented similar percentages ( $p > 0.05$ ). It was observed 70.59% (12/17), 77.78% (14/18), 50.00% (08/16) and 70.59% (12/17) pregnancy rates for animals subjected to FTAI with semen from Groups 1 (Control), 2, 3 and 4, respectively. The partial data from the present study indicate that the natural extract with non-oxidizing capacity did not alter the parameters of sperm kinetics and/or pregnancy rate, when added to the frozen semen extender, however, it did not harm the sperm cell subjected to freezing/thawing.

**Keywords:** Antioxidants, Cryopreservation, Semen Viability, Reproductive Efficiency.

## Status oxidativo sazonal no sêmen de touros *Bos indicus* e *Bos taurus* em região tropical

Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

<sup>2</sup> Department of Animal Sciences, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

A utilização de raças *Bos taurus* nos rebanhos brasileiros tem aumentado a fim de atender às novas demandas de mercado e de consumo da carne bovina. Entretanto, quando criados em climas mais quentes, esses animais não apresentam as mesmas capacidades adaptativas em comparação aos *Bos indicus*. Dentre os problemas associados a essa diferença, destaca-se o estresse térmico, que pode comprometer não só a saúde do animal mas também seu potencial reprodutivo, devido principalmente à maior formação de EROs (espécies reativas de oxigênio) relacionada a este fenômeno. Quando isso ocorre em touros utilizados em programas de reprodução o impacto é maior, uma vez que distúrbios reprodutivos podem passar despercebidos ao exame andrológico comum. Um exemplo disso é a alteração no DNA espermático, que pode resultar em perdas embrionárias até doenças transgeracionais, prejudicando a produtividade e, conseqüentemente, causando grandes prejuízos ao setor. Diante disso, foram utilizados 10 touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e oito da raça Simental (*Bos taurus taurus*) criados a pasto, na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, para conduzir o estudo visando verificar o perfil oxidativo e o DNA espermático em cada raça (Simental e Nelore) e estação do ano (verão: Janeiro/Fevereiro e inverno: Julho/Agosto), formando um arranjo fatorial 2x2. As amostras foram descongeladas e analisadas por meio dos testes de susceptibilidade ao estresse oxidativo (TBARS), mensuração da atividade de enzimas intracelulares (SOD e GPx), susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático (SCSA), atividade mitocondrial (DAB), potencial de membrana mitocondrial (JC-1), integridade de membranas plasmática e acrossomal (E/N;FITC-PSA), motilidade (CASA) e deficiência de protaminação (CMA3). Observou-se efeito de estação sobre a variável potencial de membrana mitocondrial ( $85.55 \pm 2.21\%$  e  $74.58 \pm 3.30\%$ , verão e inverno respectivamente;  $p = 0.0175$ ) e efeito raça na deficiência de protaminação ( $0.52 \pm 0.09\%$  e  $0.20 \pm 0.10\%$ , Simental e Nelore respectivamente;  $p = 0.0376$ ). Verificou-se, no inverno, correlações entre variáveis relacionadas à motilidade com variáveis de potencial de membrana mitocondrial e TBARS com SOD. Já no verão, as variáveis de motilidade correlacionam com os níveis de atividade mitocondrial e o TBARS com SOD e GPx. Na análise de componentes principais, tanto no efeito estação quanto na raça, os loadings com maior valor selecionados foram apenas de variáveis relacionadas ao metabolismo energético e ao perfil oxidativo. Esses dados evidenciam a importância do metabolismo energético e o possível efeito negativo do calor no seu funcionamento. Os resultados sugerem que a maior deficiência de protaminação no *Bos taurus* não esteja relacionada ao estresse térmico, mas sim a uma característica de raça. A inda que esta deficiência não esteja acompanhada de estresse oxidativo, a mesma parece não afetar a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático. Além disso, o caráter multifatorial e dinâmico dos parâmetros do sêmen proporcionou desafios para a identificação dos efeitos estudados, uma vez que elementos como a nutrição ou até mecanismos compensatórios do espermatozoide podem ter amenizado as diferenças esperadas.

**Palavras-chave:** Radicais livres. Sêmen animal. Bovinos. Estresse. Danos de DNA.

## Oxidative status on *Bos indicus* and *Bos taurus* semen under seasonal tropical conditions

Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Sao Paulo

<sup>2</sup>Department of Animal Sciences, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

The use of *Bos taurus* breeds in Brazilian herds has increased in order to meet new market demands and beef consumption. However, when raised in warmer climates, these animals do not present the same adaptive capabilities compared to *Bos indicus*. Among the problems associated with this difference, heat stress stands out, which can compromise not only the animals' health but also its reproductive potential, mainly due to the greater formation of ROS (reactive oxygen species) related to this phenomenon. When it affects bulls used in breeding programs the impact is even more significant, since reproductive disorders can go unnoticed by the common andrological examination. An example is the alteration in sperm DNA, which can result in embryonic lethality to transgenerational diseases, impairing productivity and, consequently, causing great losses to the industry. Therefore, 10 bulls of the Nelore breed (*Bos indicus*) and eight of the Simmental breed (*Bos taurus*) bred on pasture in the region of Dourados, Mato Grosso do Sul, were used to conduct the study to verify the oxidative profile and the Sperm DNA in each breed (Simmental and Nelore) and season of the year (summer: January/February and winter: July/August) forming a 2x2 factorial arrangement. The samples were thawed and analyzed through oxidative stress susceptibility (TBARS), measurement of intracellular enzyme activity (SOD and GPx), sperm DNA fragmentation susceptibility (SCSA), mitochondrial activity (DAB), mitochondrial membrane potential (JC-1), plasma membrane and acrosome integrity (E/N;FITC-PSA), motility (CASA) and protamination deficiency (CMA3). There was an seasonal effect on the mitochondrial membrane potential variable ( $85.55 \pm 2.21\%$  and  $74.58 \pm 3.30\%$ , summer and winter respectively;  $p = 0.0175$ ) and breed showed an effect on protamination deficiency ( $0.52 \pm 0.09\%$  and  $0.20 \pm 0.10\%$ , Simmental and Nellore respectively;  $p = 0.0376$ ). During winter, correlations were found between variables related to motility with mitochondrial membrane potential variables and TBARS with SOD. In summer, motility variables correlate with levels of mitochondrial activity and TBARS with SOD and GPx. In the principal component analysis, for the season and breed effects, the selected higher loadings were only of variables related to energy metabolism and oxidative profile. These data show the importance of energy metabolism and the possible negative effect of heat upon its functioning. The results suggest that the greater protamination deficiency in *Bos taurus* is not related to heat stress, but to a breed trait. Although not accompanied by oxidative stress, it does not seem to affect the susceptibility to sperm DNA fragmentation. Furthermore, the multifactorial and dynamic features of the semen parameters provided challenges to identify the aimed effects, since elements such as nutrition or even sperm compensatory mechanisms may have mitigated the expected differences.

**Keywords:** Free radicals. Animal semen. Bovine. Stress. DNA damage.

## Qual o efeito do tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros com células tronco mesenquimais sob as características do ejaculado?

Neimar Correa Severo<sup>1</sup>, Maurício Antonio Silva Peixer<sup>2</sup>, Marcelo da Cunha Xavier<sup>2</sup>, Teresinha Inês de Assumpção<sup>1</sup>, Patricia Furtado Malard<sup>3</sup>, Hilana dos Santos Sena Brunel<sup>4</sup>, Renata Lanconi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>2</sup>Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, Brasil

<sup>3</sup>Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil

<sup>4</sup>BIO CELL Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

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

A adenite vesicular (vesiculite) é um processo inflamatório que acomete as glândulas vesiculares do touro. Os sinais clínicos são inespecíficos ou ausentes, o que torna o diagnóstico precoce da doença ainda mais complexo na rotina. Esta enfermidade pode levar a redução da fertilidade de touros em regime de monta natural e em touros doadores de sêmen nos centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS). As células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes produzidas a partir de vários tecidos orgânicos, como por exemplo tecido adiposo. As CTMs expressam muitas moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, estimulando a angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual. O objetivo deste trabalho foi avaliar se o tratamento da vesiculite em touros com células tronco mesenquimais alogênicas de tecido adiposo influenciaria nas características seminais após o tratamento. Para isso, doze touros que apresentaram vesiculite aguda e crônica com duas ou mais recidivas, foram selecionados em CCPS, pela presença de pus no ejaculado, piócitos na lâmina de avaliação de motilidade e vigor, reagente ao teste do California Mastite Teste - CMT (uma cruz e acima) e presença de leucócitos em lâmina corada pelo Panóptico Rápido com mais de 5 polimorfonucleares (PMN) por campo. O exame ultrassonográfico das glândulas vesiculares foi realizado, porém, os sinais clínicos foram definitivos para o diagnóstico. O método de injeção intraglandular de CTMs proposto foi a aplicação através da fossa isquiorretal com agulha longa de 30 a 35cm e guia de 25 a 30cm de comprimento diretamente na glândula vesicular afetada. As CTMs foram cultivadas e congeladas no laboratório BIO CELL Terapia Celular® (Brasília, DF, Brasil) e descongeladas e preparadas por lavagem e centrifugação para a injeção intraglandular no dia da aplicação. Foram realizadas 2 aplicações (com intervalo de 40 a 60 dias entre cada uma delas) com  $3 \times 10^6$  CTMs por glândula vesicular. As comparações foram feitas com base na média de 5 colheitas de sêmen antes da aplicação das CTM e 5 colheitas após 20 dias da última aplicação do tratamento. As variáveis analisadas foram: volume do ejaculado (mL), motilidade inicial (%) em contraste de fase com aumento de 200 vezes, concentração (milhões de espermatozoides/mL), número de espermatozoides totais no ejaculado, morfologia espermática (%) avaliada em contraste de fase com aumento de 1000 vezes, motilidade pós descongelamento pelo CASA (sistema de análise computadorizada da motilidade espermática), presença de leucócitos por campo, número de unidades formadoras de colônias (UFCs) e ultrassonografia das glândulas vesiculares avaliadas em escala de 1 a 5, sendo 1- normais, 2- com áreas hipercogênicas, 3- com áreas hipercogênicas e paredes espessadas, 4- com áreas hipercogênicas, paredes espessadas e cistos, 5- com áreas hipercogênicas, paredes espessadas, cistos e presença de fibrose. Todas as variáveis foram mensuradas antes e após o tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ( $P < 0,05$ ) os dados foram transformados ou retirados os outliers e reavaliados. O Teste T pareado foi aplicado para identificar diferenças estatísticas entre as variáveis antes do tratamento e após o tratamento. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Foram observadas diferenças estatísticas significativas ( $P < 0,05$ ) na motilidade inicial de  $60,09 \pm 4,8$  antes do tratamento, para  $69,89 \pm 4,6$  ( $P < 0,05$ ) após o tratamento, bem como na motilidade pós descongelamento (PD) que era de  $26,26 \pm 6,77$  antes do tratamento e passou para  $42,5 \pm 5,99$  após tratados ( $P < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças estatísticas nas variáveis volume ( $6,15 \pm 0,91$  antes e  $6,41 \pm 0,76$  após), concentração ( $1088,52 \pm 80,82$  antes e  $943,21 \pm 100,73$  após), morfologia espermática (defeitos maiores de  $12,69 \pm 1,72$  antes e  $11,14 \pm 1,9$  após; defeitos totais de  $21,25 \pm 1,79$  antes e  $19,11 \pm 2,44$  após). A quantidade de leucócitos/campo, apesar de não ter apresentado diferença estatística, foi de  $5,83 \pm 0,48$  antes do tratamento e 0 após o tratamento e as UFCs passaram de  $26,28 \pm 14,43$  para  $18 \pm 0,1$ . Com base nos resultados apresentados, concluiu-se que a aplicação de  $3 \times 10^6$  CTMs nas glândulas vesiculares de touros com vesiculite é segura e eficiente, pois melhorou a motilidade antes e após a descongelamento dos animais tratados, além de diminuir a quantidade de leucócitos e UFCs. Não houve, neste trabalho, comparação com outros tratamentos para vesiculite. Ademais, considera-se importante ter tratamentos alternativos que modulam o sistema imune e sejam opções além dos antibióticos para tratar este tipo de afecção e evitar resistência bacteriana.

**Palavras-chave:** bovino, inflamação, glândulas vesiculares, células-tronco.

## What is the effect of treating vesicular adenitis (vesiculitis) in bulls with mesenchymal stem cells on the characteristics of the ejaculate?

Neimar Correa Severo<sup>1</sup>, Maurício Antonio Silva Peixer<sup>2</sup>, Marcelo da Cunha Xavier<sup>2</sup>, Teresinha Inês de Assumpção<sup>1</sup>, Patricia Furtado Malard<sup>3</sup>, Hilana dos Santos Sena Brunel<sup>4</sup>, Renata Lançoni<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

<sup>4</sup>BIO CELL Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil.

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

Vesicular adenitis (vesiculitis) is an inflammatory process that affects the vesicular glands of the bull. The clinical signs are nonspecific or absent, which makes early diagnosis of the disease even more complex. This disease can lead to reduced fertility in bulls in natural mating and in bulls that donate semen at semen collection and processing centers (SCPC). Allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) are characterized by being a population of multipotent cells produced from various organic tissues, such as adipose tissue. MSCs express many bioactive molecules such as adhesion molecules, extracellular matrix proteins, cytokines and receptors for growth factors, allowing them to interact with other cells. These molecules act by modulating the inflammatory response, stimulating angiogenesis and mitosis of the cells involved in the tissue repair process. The objective of this study was to evaluate whether the treatment of vesiculitis in bulls with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue would influence the seminal characteristics after treatment. Twelve bulls with acute and chronic vesiculitis with two or more recurrences were selected at Semen Collection and Processing Centers (SCPCs) for the presence of pus in the ejaculate, pyocytes on the motility and vigor evaluation slide, reactivity to the California Mastitis Test (CMT) (one cross and above) and the presence of leukocytes on a Rapid Panoptic stained slide with more than 5 polymorphonuclear cells (PMN) per field. Ultrasound examination of the vesicular glands was carried out, but the clinical signs were definitive for the diagnosis. The proposed method of intraglandular injection of MSCs was to be applied through the ischioanal fossa with a 30-35 cm long needle and a 25-30 cm long guide directly into the affected vesicular gland. The MSCs were cultured and frozen in the BIO CELL Cell Therapy<sup>®</sup> laboratory (Brasília, DF, Brazil) and thawed and prepared by washing and centrifugation for intraglandular injection on the day of application. Two applications were carried out (with an interval of 40 to 60 days between each) with  $3 \times 10^6$  CTMs per vesicular gland. Comparisons were made based on the average of 5 semen collections before the application of the MSCs and 5 semen collections 20 days after the last application of the treatment. The variables analyzed were: ejaculate volume (mL), initial motility (%) evaluated in phase contrast at 200x magnification, concentration (million sperm/mL), number of total sperm in the ejaculate, sperm morphology (%) evaluated in phase contrast at 1000x magnification, post-thaw motility evaluated in CASA system (computerized sperm motility analysis system), presence of leukocytes per field, number of colony-forming units (CFU) and ultrasound of the vesicular glands evaluated on a scale of 1 to 5: 1- normal, 2- with hyperechogenic areas, 3- with hyperechogenic areas and thickened walls, 4- with hyperechogenic areas, thickened walls and cysts, 5- with hyperechogenic areas, thickened walls, cysts and presence of fibrosis. All variables were measured before and after treatment. The data was assessed for the normality of the residuals using the Shapiro-Wilk test. When the normality test was significant ( $P < 0.05$ ) the data was transformed or outliers removed and re-evaluated. The paired t-test was applied to identify statistical differences between the variables before treatment and after treatment. Data were presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) were observed in initial motility from  $60.09 \pm 4.8$  before treatment to  $69.89 \pm 4.6$  ( $P < 0.05$ ) after treatment, as well as in post-thaw (PT) motility, which was  $26.26 \pm 6.77$  before treatment and to  $42.5 \pm 5.99$  after treatment ( $P < 0.05$ ). No statistical differences were observed in the variables volume ( $6.15 \pm 0.91$  before  $6.41 \pm 0.76$  after), concentration ( $1088.52 \pm 80.82$  before and to  $943.21 \pm 100.73$  after), sperm morphology (major defects -  $12.69 \pm 1.72$  before and  $11.14 \pm 1.9$  after; total defects -  $21.25 \pm 1.79$  before and  $19.11 \pm 2.44$  after). The number of leukocytes/field, although there was no statistical difference, was  $5.83 \pm 0.48$  before treatment and 0 after treatment and the CFUs went from  $26.28 \pm 14.43$  to  $18 \pm 0.1$ . Based on the results presented, it was concluded that the application of  $3 \times 10^6$  MSCs to the vesicular glands of bulls with vesiculitis is safe and efficient, as it improved motility before and after thawing the treated animals, as well as reducing the number of leukocytes and CFUs. In this study, there was no comparison with other treatments for vesiculitis. It is also important to have alternative treatments that modulate the immune system and are options other than antibiotics to treat this type of condition and avoid bacterial resistance.

**Keywords:** bovine, inflammation, vesicular glands, stem cells.



## Efeito de suplementação vitamínica e mineral sob a qualidade do sêmen de touros jovens da raça Brangus

Mariana de Almeida Fernandes<sup>1</sup>, Gabriel Daltoé de Almeida<sup>1</sup>, André Maciel Crespilho<sup>2</sup>, Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>3</sup>, Rosiara Rosaria Dias Maziero Guaitolini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Cascavel, Univel, Cascavel, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Santo Amaro – Unisa, São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>CRV Lagoa, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

\*e-mail: marifeernandes16@gmail.com; rosiamamaziero@gmail.com

A importância da fertilidade dos touros em sistemas de produção de bovinos de corte é evidente, e a qualidade do sêmen é um fator indispensável na taxa de prenhez/ano. Os principais desafios sob as variações nas características seminais surgem devido às práticas de manejo, qualidade de pastagens, condições tropicais e idade dos reprodutores. Em resposta a estes desafios a indústria oferece suplementos alimentares enriquecidos com vitaminas, minerais e ácidos graxos essenciais, reconhecidos por melhorar o desempenho reprodutivo dos bovinos. A exposição à fatores adversos, principalmente deficiências nutricionais podem levar a degenerações e disfunções nos órgãos reprodutivos, resultando em queda de fertilidade. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade espermática de touros da raça Brangus, criados em sistema extensivo, submetidos à suplementação vitamínica e mineral à base de betacaroteno, L-carnitina, ômega 3, coenzima Q10, zinco, vitamina C, vitamina B12, vitamina E, vitamina A, selênio e outros componentes. Neste sentido, foram utilizados 10 animais, com idade entre 14 e 17 meses, divididos em grupo controle (n= 5) e grupo tratado (n= 5), submetidos a administração semanal de 60 mL do produto Botumix Touro<sup>®</sup> (Botupharma Biotecnologia Animal), via oral, por um período de 6 semanas. No início do estudo, os animais do grupo controle apresentaram peso médio de 338 ± 2,4 Kg e os animais do grupo controle, peso médio de 351 ± 1,8 Kg. Os animais, tanto do grupo controle, quanto tratado, foram submetidos também a colheita de sêmen, semanalmente, imediatamente após a suplementação, para a avaliação dos parâmetros de cinética espermática como motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MOTP,%) e vigor, concentração espermática, turbilhonamento, perímetro escrotal (PE – perímetro escrotal médio do grupo controle foi de 30,3 ± 3,1 cm x grupo tratado de 32,4 ± 2,5 cm), pesagem e viabilidade espermática (integridade de membrana plasmática - Botuvital<sup>®</sup> - Botupharma Biotecnologia Animal) e morfologia espermática classificada em defeitos maiores, menores e defeitos totais. Diante dos dados obtidos, foi possível observar que a concentração espermática média [C] do grupo controle foi de 33 ± 20,9 x 10<sup>6</sup> spz/mL e do grupo tratado foi de 35,26 x 10<sup>6</sup> ± 14,7 spz/mL. A motilidade espermática total (MT, %) média do grupo controle foi de 74 ± 9,9 e do grupo tratado foi de 73,6 ± 11,61. A motilidade espermática progressiva média (MOTP,%) do grupo controle foi de 37,3 ± 8,63, enquanto no grupo tratado foi de 38,1 ± 8,1. O vigor espermático médio do grupo controle foi de 3,36 ± 0,76 e do grupo tratado 3,43 ± 0,61. Com relação a morfologia espermática verificou-se que o grupo tratado apresentou menor incidência de defeitos maiores, em relação ao grupo controle (15,46 ± 10,13 % grupo controle x 14,16 ± 6,51 % para o grupo tratado; p = 0,02). A média de defeitos totais no grupo controle foi 30 ± 17,11 %, já o tratado teve média de 25,9 ± 10,61 %. A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, no grupo controle, a média foi de 50 ± 5,10 % e do grupo tratado foi de 56,54 ± 3,62 %. No grupo controle, o perímetro escrotal médio foi de 31,9 ± 2,7 cm e do grupo tratado foi de 34,2 ± 3,2 cm. Com relação ao peso corporal, o valor médio dos animais do grupo controle foi de 360,8 ± 2,1 kg e do grupo tratado de 393,4 ± 2,7 kg. Vale ressaltar que, os animais estavam em fase de crescimento e desenvolvimento, dessa forma, o peso corporal e o perímetro escrotal, tanto do grupo tratado, quanto do grupo controle, aumentaram ao final do experimento. De acordo com os resultados obtidos, pôde-se concluir que a suplementação vitamínica e mineral, administrada por via oral, semanalmente, em touros jovens da raça Brangus reduziu a incidência de defeitos maiores nos ejaculados destes animais.

**Palavras-chave:** Bovinos, cinética espermática, suplementação vitamínica e mineral, viabilidade espermática.

## Effect of vitaminic and mineral supplementation on the semen quality of young brangus Bulls

Mariana de Almeida Fernandes<sup>1</sup>, Gabriel Daltoé de Almeida<sup>1</sup>, André Maciel Crespilha<sup>2</sup>, Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>3</sup>, Rosiara Rosaria Dias Maziero Guaitolini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Cascavel, Univel, Cascavel, Paraná, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Santo Amaro – Unisa, São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>3</sup>CRV Lagoa, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

\*e-mail: marifefernandes16@gmail.com; rosiamaziero@gmail.com

The importance of bull fertility in beef cattle production systems is evident, and semen quality is an indispensable factor in the pregnancy rate per year. The main challenges regarding variations in seminal characteristics arise from management practices, pasture quality, tropical conditions, and the age of the breeders. In response to these challenges, the industry offers dietary supplements enriched with vitamins, minerals, and essential fatty acids, known to improve the reproductive performance of cattle. Exposure to adverse factors, primarily nutritional deficiencies, can lead to degeneration and dysfunction in the reproductive organs, resulting in decreased fertility. In light of this, the present study aimed to evaluate the sperm quality of Brangus bulls raised in an extensive system, subjected to vitamin and mineral supplementation based on beta-carotene, L-carnitine, omega-3, coenzyme Q10, zinc, vitamin C, vitamin B12, vitamin E, vitamin A, selenium, and other components. In this regard, 10 animals aged between 14 and 17 months were used, divided into a control group (n = 5) and a treated group (n = 5), subjected to weekly administration of 60 mL of the product Botumix Touro<sup>®</sup> (Botupharma Animal Biotechnology) orally for a period of 6 weeks. At the beginning of the study, the animals in the control group had an average weight of 338 ± 2.4 kg and those in the treated group had an average weight of 351 ± 1.8 kg. Both groups of animals were also subjected to semen collection weekly, immediately after supplementation, for the evaluation of sperm kinetic parameters such as total motility (MT, %), progressive motility (MOTP, %), and vigor, sperm concentration, whirlpooling, scrotal circumference (SC - average scrotal circumference of the control group was 30.3 ± 3.1 cm x treated group 32.4 ± 2.5 cm), weighing, and sperm viability (plasma membrane integrity - Botuvital<sup>®</sup> - Botupharma Animal Biotechnology) and sperm morphology classified into major defects, minor defects, and total defects. Based on the data obtained, it was observed that the mean sperm concentration [C] of the control group was 33 ± 20.9 x 10<sup>6</sup> spz/mL and of the treated group was 35.26 x 10<sup>6</sup> ± 14.7 spz/mL. The mean total sperm motility (MT, %) of the control group was 74 ± 9.9 and of the treated group was 73.6 ± 11.61. The mean progressive sperm motility (MOTP, %) of the control group was 37.3 ± 8.63, while in the treated group it was 38.1 ± 8.1. The mean sperm vigor of the control group was 3.36 ± 0.76 and of the treated group was 3.43 ± 0.61. Regarding sperm morphology, it was found that the treated group presented a lower incidence of major defects compared to the control group (15.46 ± 10.13 % control group vs. 14.16 ± 6.51 % for the treated group; p = 0.02). The mean total defects in the control group were 30 ± 17.11 %, while the treated group had a mean of 25.9 ± 10.61 %. The integrity of the sperm plasma membrane, in the control group, had a mean of 50 ± 5.10% and in the treated group was 56.54 ± 3.62%. In the control group, the mean scrotal circumference was 31.9 ± 2.7 cm and in the treated group was 34.2 ± 3.2 cm. Regarding body weight, the mean value of the animals in the control group was 360.8 ± 2.1 kg and in the treated group was 393.4 ± 2.7 kg. It is worth noting that the animals were in a phase of growth and development; thus, the body weight and scrotal circumference, both of the treated group and the control group, increased at the end of the experiment. Based on the results obtained, it can be concluded that vitamin and mineral supplementation, administered orally weekly, in young Brangus bulls, reduced the incidence of major defects in the ejaculates of these animals.

**Keywords:** Bovine, sperm kinetics, sperm viability, vitamin and mineral supplementation.

## Caracterização de subpopulações por parâmetros cinéticos de amostras seminais criopreservadas de bovinos utilizando machine learning não supervisionado

Henrique Thomazo Frias<sup>1\*</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>2</sup>, Camila Motta Mendes<sup>2</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpcao<sup>2</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup> Laboratório de Biologia dos Espermatozoides (BioSptz) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil  
\*e-mail: henrique.frias@usp.br

A seleção de touros reprodutores para fertilidade e o uso de biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial e IATF utilizando sêmen criopreservado (que permite a verificação do potencial de fertilidade desses touros em grande escala) são estratégias para a melhorar a eficiência reprodutiva utilizadas em rebanhos bovinos em todo o país. A análise de motilidade espermática é amplamente empregada na rotina de centrais comerciais de coleta de sêmen bovino (muitas por análise computadorizada do sêmen com sistemas CASA), sendo um dos indicadores de qualidade seminal de touros em regime de. Porém, reprodutores com parâmetros de motilidade espermática semelhantes podem apresentar resultados de fertilidade à campo distintos. É possível que isso aconteça por conta da heterogeneidade dos espermatozoides presentes em cada ejaculado. Uma das formas de identificar e caracterizar essas subpopulações de acordo com seus padrões cinéticos é a aplicação de técnicas de machine learning não supervisionadas, como a análise de cluster. Essa análise agrupa células que possuem valores de cinética semelhantes entre si, constituindo assim essas subpopulações. Foram utilizadas amostras de sêmen criopreservadas de 16 touros diferentes (n=16), analisadas imediatamente após o descongelamento e após protocolo de seleção espermática por Percoll® quanto a motilidade no sistema CASA (Hamilton-Thorne, Ivos® 2 Sperm Analyser, USA) em lâminas Leja (Leja Products B.V®, Holanda). Todas as análises estatísticas e de clusterização foram realizadas no software Rstudio. Com os resultados das variáveis de cinética de cada espermatozoide (Velocidade média de percurso – VAP; Velocidade retilínea – VSL; Velocidade curvilínea – VCL; Amplitude do movimento lateral da cabeça – ALH; Frequência de batimento cruzado – BCF; e Linearidade – LIN), foi realizada então a análise de cluster pelo método *k-means*, com o número de clusters pré definidos pelo método de *Elbow* (que identificou um número ótimo de clusters  $k=4$ ), onde todas as variáveis cinéticas utilizadas apresentaram significância na formação de pelo menos 1 cluster (ANOVA,  $P<0.0001$ ), com a formação de 4 subpopulações espermáticas em ambos momentos de análise (Pós-Descongelamento e Pós-Percoll) que foram classificadas como: SP1 (alta LIN, baixo ALH); SP2 (alta velocidade); SP3 (espermatozoides lentos); e SP4 (alto ALH e VCL, baixa LIN). Observou-se um aumento na frequência de células nas SP2 e SP4 com diminuição da SP3 após o protocolo de seleção por Percoll. Além disso, espermatozoides com valores mais altos de ALH e VCL com baixa linearidade parecem ser capazes de vencer o gradiente de densidade assim como células com alta LIN. A análise de cluster se mostrou uma ferramenta útil na identificação de subpopulações espermáticas distintas em uma mesma amostra e pode auxiliar na avaliação da qualidade espermática utilizando-se parâmetros cinéticos.

**Palavras-chave:** sêmen bovino; análise de cluster, Percoll, motilidade.

**Agradecimentos:** À empresa Seleon Biotecnologia por fornecer as amostras utilizadas e à IMV Technologies Brasil.

## Characterization of sperm subpopulations by kinetic parameters of bull cryopreserved semen using unsupervised machine learning

Henrique Thomazo Frias<sup>1\*</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>2</sup>, Camila Motta Mendes<sup>2</sup>, Mayra Elena Ortiz D' Avila Assumpcao<sup>2</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup> Laboratório de Biologia dos Espermatozoides (BioSptz) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil  
\*e-mail: henrique.frias@usp.br

The selection of breeding bulls for fertility and the use of reproductive biotechnologies such as artificial insemination and TAI with cryopreserved semen (which allows the verification of the fertility potential of these bulls on a large scale) are strategies to improve reproductive efficiency in cattle herds. Sperm motility analysis is widely used in the routine of commercial bovine semen collection centers (many also utilizing computerized semen analysis with CASA systems), being one of the indicators of seminal quality in bulls under a semen collection regime. However, ejaculates with similar sperm motility parameters may present different fertility results in the field. It is possible that this happens due to the heterogeneity of the sperm present in each ejaculate. One of the ways to identify and characterize these subpopulations according to their kinetic patterns is the application of unsupervised machine learning techniques, such as cluster analysis. This analysis groups cells that have similar kinetic values to each other, thus constituting these subpopulations. Cryopreserved semen samples from 16 different bulls (n=16) were used, analyzed for motility immediately post thawing and again after a sperm selection protocol using Percoll® in a CASA system (Hamilton-Thorne,IVOS® 2 Sperm Analyser, USA) with Leja chambers (Leja Products B.V.®, Netherlands). All statistical and clustering analyzes were performed in Rstudio software. With the results of the kinetic variables of each sperm (Average path velocity – VAP; Straight line velocity – VSL; Curvilinear velocity – VCL; Amplitude of lateral movement of the head – ALH; Cross beat frequency – BCF; and Linearity – LIN), cluster analysis was then carried out using the k-means method, with the number of clusters pre-defined by the Elbow method (which identified an optimal number of clusters k=4), where all kinetic variables used showed significance in the formation of at least 1 cluster (ANOVA, P<0.0001), which formed 4 sperm subpopulations for the two times of analysis (Post-Thaw and Post-Percoll) which were classified as: SP1 (high LIN, low ALH); SP2 (high velocity); SP3 (slow sperm); and SP4 (high ALH and VCL, low LIN). An increase in the frequency of cells in SP2 and SP4 was observed with a decrease in SP3 after the Percoll selection protocol. Furthermore, sperm with higher values of ALH and VCL with low linearity seem to be able to overcome the density gradient as well as cells with high LIN. Cluster analysis proved to be a useful tool in identifying distinct sperm subpopulations in the same sample and can help in evaluating sperm quality utilizing kinetic parameters.

**Keywords:** bovine semen; cluster analysis, Percoll, motility.

**Acknowledgments:** To the company Seleon Biotecnologia for providing the samples used and to IMV Technologies Brasil.

## Motilidade Total e Progressiva como Parâmetros para Predição de Fertilidade em Ovinos

**Eduardo de Oliveira Costa<sup>\*2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Esther Kayla dos Santos Matos<sup>3</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>4</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup> Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>4</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>5</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA; <sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup> Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: rfb@ufba.br

A reprodução eficiente em ovinos desempenha um papel fundamental na sustentabilidade econômica e na produtividade dos rebanhos. A avaliação da motilidade espermática total e progressiva durante um exame andrológico é um dos principais determinantes da fertilidade em mamíferos como um todo. Este parâmetro não apenas reflete a viabilidade e qualidade dos espermatozoides, mas também influencia diretamente a capacidade de fertilização e, consequentemente, o sucesso reprodutivo. A motilidade espermática é caracterizada pela habilidade dos espermatozoides de se moverem de forma coordenada e direcional. Enquanto a motilidade total refere-se à capacidade geral dos espermatozoides de se moverem, independentemente da direção, a motilidade progressiva engloba especificamente os espermatozoides que se movem em uma trajetória linear, indicando um potencial mais elevado de alcançar o óvulo e realizar a fertilização com sucesso. Portanto, a avaliação combinada desses dois parâmetros oferece uma visão abrangente da funcionalidade dos espermatozoides e da sua adequação para o processo de reprodução. Neste contexto, objetivou-se avaliar com esse estudo o efeito da motilidade total e a motilidade progressiva na fertilidade de ovinos submetidos a inseminação artificial. Para isso, foram levantados dados de 415 inseminações. As partidas de sêmen utilizadas nos programas de IATF foram divididas em grupos de acordo com a qualidade da cinética espermática avaliada por um sistema computadorizado modelo IVOS 12 (Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, EUA) (Set Up VAP 75 $\mu$ /s, STR 80%), sendo, para a motilidade total, o grupo 1:  $\leq 30\%$ ; grupo 2:  $>30\%$  e  $<50\%$  e o grupo 3:  $\geq 50\%$ ; e, de forma similar, a motilidade progressiva dividida em grupo 1:  $\leq 30\%$ ; grupo 2:  $>30\%$  e  $<50\%$  e o grupo 3:  $\geq 50\%$ , posteriormente os grupos foram comparados entre si pela taxa de concepção. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade, sendo as médias comparadas pela ANOVA. As taxas de fertilidade nos grupos de motilidade total foram, respectivamente, 30,7%, 27,5% e 35,4%. Já para os grupos de motilidade progressiva apresentaram taxas de fertilidade de 27,5%, 25,4 e 41,7%, respectivamente. Não houve diferença estatística entre as taxas de fertilidade média para os grupos de motilidade total ( $p>0,05$ ), no entanto, foi observada diferença estatística da fertilidade para o grupo 3 da motilidade progressiva ( $p<0,05$ ). Isso possivelmente está relacionado ao fato de que espermatozoides com adequada motilidade progressiva possuem maiores probabilidades de deslocamento pelo trato reprodutivo feminino até o sítio de ovulação, favorecendo a concepção. Em contrapartida, valores abaixo de 50% de motilidade progressiva podem gerar resultados insatisfatórios dentro de programas de IATF. Desta forma, a avaliação da motilidade progressiva durante a avaliação andrológica e espermograma não apenas fornece insights sobre a qualidade individual dos espermatozoides, como também prediz sua capacidade de desempenhar seu papel biológico no momento da fertilização. Em suma, a implementação de métodos precisos e padronizados para a avaliação desse parâmetro não apenas permite uma seleção mais eficaz de reprodutores de alta qualidade, mas também contribui significativamente para o aprimoramento dos programas de reprodução e melhoramento genético em ovinos.

**Palavras-chaves:** Carneiros, IATF em ovinos, avaliações andrológicas, cinética.

## Total and Progressive Motility as Parameters for Predicting Fertility in Sheep

Eduardo de Oliveira Costa<sup>\*2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Esther Kayla dos Santos Matos<sup>3</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup> Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>4</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>5</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA; <sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup> Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: rfb@ufba.br

Efficient reproduction in sheep plays a fundamental role in herds' economic sustainability and productivity. The assessment of total and progressive sperm motility during an andrological examination is one of the critical determinants of fertility in mammals. This parameter reflects the viability and quality of spermatozoa and directly influences fertilization capacity and, consequently, reproductive success. Sperm motility is characterized by the ability of spermatozoa to move in a coordinated and directional manner. While total motility refers to the overall ability of spermatozoa to move regardless of direction, progressive motility specifically encompasses spermatozoa moving in a linear trajectory, indicating a higher potential to reach the ovum and successfully fertilize it. Therefore, the combined evaluation of these two parameters provides a comprehensive view of sperm functionality and its suitability for the reproductive process. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of total motility and progressive motility on the fertility of sheep subjected to artificial insemination. Data from 415 inseminations were collected for this purpose. The semen batches used in the fixed-time artificial insemination (FTAI) programs were divided into groups according to the quality of sperm kinetics evaluated by a computerized system model IVOS 12 (Hamilton et al., USA) (VAP Setup 75 $\mu$ /s, STR 80%). For total motility, group 1:  $\leq 30\%$ ; group 2:  $>30\%$  and  $<50\%$ ; and group 3:  $\geq 50\%$ . Similarly, progressive motility was divided into group 1:  $\leq 30\%$ ; group 2:  $>30\%$  and  $<50\%$ ; and group 3:  $\geq 50\%$ . These groups were then compared for the conception rate. The obtained results were subjected to normality and homogeneity tests, and ANOVA compared means. Fertility rates in the total motility groups were 30.7%, 27.5%, and 35.4%, respectively. For the progressive motility groups, fertility rates were 27.5%, 25.4%, and 41.7%, respectively. There was no statistical difference between the mean fertility rates for the total motility groups ( $p>0.05$ ); however, a statistical difference in fertility was observed for group 3 of progressive motility ( $p<0.05$ ). This is possibly related to the fact that spermatozoa with adequate progressive motility have a higher probability of traversing the female reproductive tract and reaching the ovum, favoring conception. Conversely, values below 50% of progressive motility can yield unsatisfactory results within FTAI programs. Thus, the evaluation of progressive motility during andrological examination and semen analysis not only provides insights into the individual quality of spermatozoa but also predicts their ability to fulfill their biological role during fertilization. In summary, implementing precise and standardized methods for evaluating this parameter allows for a more effective selection of high-quality breeders and significantly contributes to the improvement of reproduction programs and genetic enhancement in sheep.

**Keywords:** Rams, FTAI in sheep, andrological evaluations, kinetics.

## Uso da Termografia como Método Auxiliar de Exame Andrológico em Ovinos Antes e Após a Monta

**Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2\*</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Natália Borges Miranda<sup>1</sup>, Esther Kayla dos Santos Matos<sup>3</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>4</sup>, Marcus Vinicius Galvão Loiola<sup>5</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA; <sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup> Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

A termografia é uma metodologia que proporciona uma medição segura e não invasiva, por meio da radiação infravermelha, da perda de calor corporal pela superfície da pele. Essa técnica oferece dados fisiológicos de rápida e fácil obtenção, constituindo em um importante parâmetro para avaliações clínicas. Dessa forma, o uso dessa tecnologia tem sido válido como recurso complementar para diagnóstico em avaliações andrológicas, principalmente para mapeamento da termorregulação escrotal. O aumento da temperatura do escroto pode ocorrer de forma fisiológica ou patológica, ou ainda relacionado a eventos, tais como, variações de clima, exercícios e atividade sexual que, quando ocorrem de forma intensa e por períodos prolongados, como por exemplo as estações de monta mais intensas, podem levar a um estresse térmico e comprometer, em médio a longo prazo, a espermatogênese e aumentar os índices de defeitos menores e/ou maiores. Assim, o estudo teve como objetivo inicial comparar a variação térmica da superfície escrotal de ovinos antes e após uma monta completa para coleta de sêmen. Para isso, foi utilizada uma câmera termográfica modelo FLIR ONE posicionada a aproximadamente 60 cm de distância da face caudal do escroto do animal. As imagens foram capturadas em até 10 minutos antes e até 10 minutos após a monta, sendo posteriormente analisadas com o uso do software FLIR Tools (FLIR Systems, Inc.). As temperaturas foram avaliadas no programa por meio da ferramenta de medição em ponto, sendo o ponto 1: ponto central da superfície caudal do escroto e o ponto 2: ponto intermediário entre os cordões espermáticos; e em elipse que abrangeu a maior área superfície caudal do escroto, demonstrando o ponto de maior e de menor temperatura e sua média. Quanto aos animais, foram utilizados um total de 5 ovinos com aproximadamente 1 ano de idade, sendo a coleta de dados realizada nos turnos da manhã e da tarde durante 3 dias consecutivos. Os dados obtidos foram submetidos a teste estatísticos de normalidade pelo método de Shapiro-Wilk, sendo os dados não paramétricos comparados pelo teste de Mann-Whitney. Antes da atividade de monta, foram observados valores de mediana para temperatura de 35,5°C para o ponto 1, 37,8°C para o ponto 2 e 35,0°C para a área da superfície escrotal, sendo os valores apresentados após a monta de 36,0°C para o ponto 1, 38,1°C para o ponto 2 e 35,2°C para a área da superfície escrotal, não sendo observada diferença estatística entre os dois momentos. Tal estabilidade térmica pode estar relacionada ao eficiente mecanismo de regulação da temperatura do escroto e testículos, o que garante a manutenção adequada da espermatogênese. Com base nisso, pode-se afirmar que a atividade sexual pontual dos ovinos não apresenta impactos significativos na termorregulação escrotal em curto prazo, no entanto, em casos isolados, foi possível observar diferenças de até 4°C a mais na média de temperatura da área da superfície caudal do escroto após a monta. Isso demonstra o poder da termografia em identificar reprodutores com possíveis déficit de termorregulação escrotal, podendo ser uma ferramenta útil de seleção. Pesquisas com graus de atividade sexual mais intensas e com menor intervalo entre a aferição térmica e a atividade sexual podem ser necessárias para confirmação desses achados. Por fim, os dados preliminares apresentados neste estudo contribuem para o crescente corpo de literatura que valida o uso da termografia como uma ferramenta útil em avaliações andrológicas.

**Palavras-chaves:** Ovinocultura, termorregulação, avaliações andrológicas, imagens térmicas, infravermelho.

## Thermography as an Auxiliary Tool for Andrological Examination in Sheep Before and After Mating

Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2\*</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Natália Borges Miranda<sup>1</sup>, Esther Kayla dos Santos Matos<sup>3</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>4</sup>, Marcus Vinicius Galvão Loiola<sup>5</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA;

<sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup> Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

Thermography is a methodology that provides a safe and non-invasive measurement, through infrared radiation, of the body heat loss through the skin surface. This technique offers physiological data that are quickly and easily obtained, constituting an essential parameter for clinical evaluations. Therefore, this technology has been valuable as a complementary resource for diagnosis in andrological evaluations, mainly for mapping scrotal thermoregulation. The increase in scrotal temperature can occur physiologically or pathologically or even be related to events such as climate variations, exercise, and sexual activity, which, when intense and prolonged, such as during intense mating seasons, can lead to thermal stress and compromise, in the medium to long term, spermatogenesis and increase the rates of minor and major defects. Thus, the study aimed to initially compare the thermal variation of the scrotal surface of sheep before and after a complete mating for semen collection. For this, a FLIR ONE thermal camera was used approximately 60 cm away from the animal's scrotum's caudal face. The images were captured up to 10 minutes before and up to 10 minutes after mating and subsequently analyzed using FLIR Tools software (FLIR Systems, Inc.). Temperatures were evaluated in the program using the point measurement tool, with point 1 being the central point of the caudal surface of the scrotum and point 2 being the midpoint between the spermatic cords, and in an ellipse covering the largest surface area of the caudal scrotum, showing the point of highest and lowest temperature and their mean. Regarding the animals, a total of 5 sheep, approximately one year old, were used, with data collection performed in the morning and afternoon shifts for three consecutive days. The obtained data were subjected to normality tests using the Shapiro-Wilk method, with non-parametric data compared using the Mann-Whitney test. Before mating activity, median temperatures of 35.5°C were observed for point 1, 37.8°C for point 2, and 35.0°C for the scrotal surface area, with values presented after mating of 36.0°C for point 1, 38.1°C for point 2, and 35.2°C for the scrotal surface area, with no statistical difference observed between the two moments. This thermal stability may be related to the efficient mechanism of scrotal and testicular temperature regulation, which ensures proper maintenance of spermatogenesis. Based on this, it can be stated that the punctual sexual activity of sheep does not present significant impacts on scrotal thermoregulation in the short term; however, in isolated cases, differences of up to 4°C higher in the mean temperature of the caudal scrotal surface area were observed after mating. This demonstrates the power of thermography in identifying breeders with possible deficits in scrotal thermoregulation, being a useful selection tool. Research with higher degrees of sexual activity and shorter intervals between thermal measurement and sexual activity may be necessary to confirm these findings. Finally, the data presented in this study contribute to the growing body of literature that validates the use of thermography as a valuable tool in andrological evaluations.

**Keywords:** Sheep farming, thermoregulation, andrological evaluations, thermal imaging, infrared.



## Número de espermatozoides com motilidade total e progressiva e sua influência na fertilidade de ovinos

**Eduardo de Oliveira Costa<sup>\*2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Esther Kayla dos Santos Matos<sup>3</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>4</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup> Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>4</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>5</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA; <sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup> Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: rfb@ufba.br

A eficiência reprodutiva de um rebanho representa um dos pontos fundamentais para que uma atividade pecuária seja economicamente viável. Em um programa de reprodução assistida, como a IATF, a qualidade do sêmen utilizado reflete diretamente nessa eficiência, sendo diversos os aspectos de qualidade a serem levados em consideração. A motilidade espermática total e progressiva representam a capacidade dos espermatozoides de se deslocarem dentro do trato genital feminino e alcançarem o óvulo, sendo que o número de espermatozoides nessas categorias pode influenciar diretamente na taxa de fertilidade de um programa de inseminação. Neste sentido, objetivou-se avaliar com esse estudo o efeito do número de espermatozoides com motilidade total e com motilidade progressiva na taxa de fertilidade de ovinos submetidos a inseminação artificial. Para isso, foram levantados dados de 415 inseminações. As partidas de sêmen utilizadas nos programas de IATF foram divididas em grupos de acordo com a quantidade de espermatozoides nessas categorias avaliada por um sistema computadorizado modelo IVOS 12 (Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, EUA) (Set Up VAP 75µ/s, STR 80%), sendo, para o número de espermatozoides com motilidade total, o grupo 1: < 40 x10<sup>6</sup> e grupo 2: ≥ 40 x10<sup>6</sup> e, de forma similar, o número de espermatozoides com motilidade progressiva dividido em grupo 1: < 40 x10<sup>6</sup> e grupo 2: ≥ 40 x10<sup>6</sup>. Os grupos foram compostos utilizando a dose inseminante recomendada pelo Manual de Andrologia do CBRA, para uso do sêmen ovino congelado-descongelado. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si para a taxa de concepção. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade, sendo as médias comparadas pela ANOVA. As taxas de fertilidade nos grupos de motilidade total foram, respectivamente, 32,1% e 33,8%. Já os grupos de motilidade progressiva apresentaram taxas de fertilidade de 25,8% e 37,5%, respectivamente. Não houve diferença (p>0,05) entre as taxas de fertilidade para os grupos de motilidade total, no entanto, foi observada diferença (p<0,05) na taxa de fertilidade entre os grupos da motilidade progressiva (p<0,05). Tal achado pode ser justificado pelo fato de um maior número de células na dose inseminante, com adequada motilidade progressiva, podem proporcionar maior número de células migrando com sucesso através do trato reprodutivo feminino, com células viáveis atingindo o sítio de ovulação. Por outro lado, o uso de doses inseminantes com menos de 40 x10<sup>6</sup> de espermatozoides com motilidade progressiva podem gerar resultados abaixo do esperado dentro dos programas de IATF. Desta forma, ajustes na dose inseminante, durante o processamento e preparo do sêmen, para a quantidade de espermatozoides com motilidade progressiva (acima de 40 x10<sup>6</sup>) podem garantir melhora nas taxas de fertilidade, melhorando assim o desempenho do programa de inseminação e favorecendo a evolução do rebanho.

**Palavras-chaves:** Carneiros, IATF em ovinos, avaliações andrológicas, cinética.

## Total and progressive motility as parameters for predicting fertility in sheep

**Eduardo de Oliveira Costa<sup>\*2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Esther Kayla dos Santos Matos<sup>3</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>4</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup> Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>4</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>5</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>5</sup>.**

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA; <sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup> Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Professor do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil.

\*E-mail: rfb@ufba.br

The reproductive efficiency of a herd represents one of the fundamental points for livestock activity to be economically viable. In an assisted reproduction program, such as FTAI, the quality of the semen used directly reflects on this efficiency, with several aspects of quality to be considered. Total and progressive sperm motility represent the sperm's ability to move within the female genital tract and reach the egg, and the number of sperm in these categories can directly influence the fertility rate of an insemination program. In this sense, this study aimed to evaluate the effect of the number of sperm with total motility and progressive motility on the fertility rate of sheep subjected to artificial insemination. For this purpose, data from 415 inseminations were collected. The semen batches used in the FTAI programs were divided into groups according to the quantity of sperm in these categories evaluated by a computerized system model IVOS 12 (Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, USA) (Set Up VAP 75 $\mu$ /s, STR 80%), being, for the number of sperm with total motility, group 1:  $<40 \times 10^6$  and group 2:  $\geq 40 \times 10^6$  and, similarly, the number of sperm with progressive motility divided into group 1:  $<40 \times 10^6$  and group 2:  $\geq 40 \times 10^6$ . Subsequently, the groups were compared for the conception rate. The obtained results were subjected to normality and homogeneity tests, and ANOVA was used to compare the means. The fertility rates in the total motility groups were 32.1% and 33.8%, respectively. The progressive motility groups presented 25.8% and 37.5% fertility rates, respectively. There was no statistical difference between the average fertility rates for the total motility groups ( $p > 0.05$ ); however, a statistical difference in fertility was observed among the progressive motility groups ( $p < 0.05$ ). This finding can be justified because sperm with adequate progressive motility have a greater probability of traversing the female reproductive tract and reaching the egg, favoring conception. On the other hand, the use of semen with less than  $40 \times 10^6$  sperm with progressive motility may yield results below expectations within FTAI programs. Thus, adjustments in the inseminating dose, during semen processing and preparation, for the quantity of sperm with progressive motility (above  $40 \times 10^6$ ) can ensure improvement in fertility rates, thereby enhancing the performance of the insemination program and favoring herd evolution.

**Keywords:** Rams, FTAI in sheep, andrological evaluations, kinetics.

## **Classificação Andrológica de Touros avaliada por Machine Learning**

**Silvio André Isler<sup>1</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>2</sup>, Ériklis Nogueira<sup>3</sup>, Vanessa Aparecida de Moraes Weber<sup>1</sup>, Felipe de Oliveira Pedro<sup>1</sup>, Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>, Dauydisson Antonio Gonzalez Cordeiro<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>3</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>4</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil  
\*e-mail: islersilvio@gmail.com

O estudo foi realizado com o objetivo de verificar o comportamento da classificação dos Exames Andrológicos (EA) de touros utilizados em monta natural através do Aprendizado de Máquina (ML). Utilizou-se um banco de dados de EA de 2308 touros, com os seguintes atributos para cada exame: região, raça, genótipo, classe de idade, consistência testicular, circunferência escrotal, volume de sêmen, turbilhonamento espermático, motilidade espermática, vigor espermático, defeito de acrossoma, gota citoplasmática proximal, defeito de cabeça, defeito de peça média, defeitos maiores totais, gota citoplasmática distal, cabeça isolada normal, defeitos de cauda, defeitos menores totais, defeitos totais e espermatozoides normais totais. A classificação desses animais para cada teste foi feita como aptos (n = 1088), inaptos (n = 672) e questionáveis (n = 548). Esta base de dados foi submetida à ferramenta de ML Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA) através da sua ferramenta Auto Weka, que sugeriu o algoritmo Random Forest, (uma coleção de árvores de decisão). O ML foi capaz de identificar resultados semelhantes ao EA para a maioria dos touros, principalmente para os animais classificados como aptos (94,1% - 1024/1088) e inaptos (95,2% - 522/548). Para os animais classificados como duvidosos, os resultados do ML coincidiram com os do EA em apenas 59,5% (400/672) dos touros. Assim, de um modo geral, 84% (1946/2308) dos touros têm os mesmos resultados utilizando o ML em relação aos EA, com um erro absoluto médio de 0,1651 e um erro quadrático médio de 0,2761. Concluimos que a ML pode ser utilizada para auxiliar os andrologistas na classificação dos resultados dos EA. Estudos futuros poderão aumentar a precisão e até determinar quais as características que melhor representam as classes na classificação final usando ML.

**Palavras-chave:** Exames Andrológicos, Monta Natural, Random Forest, WEKA.

**Agradecimentos:** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação para o Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia em Mato Grosso do Sul (FUNDECT/SECTEI, processo 16/2016).

## Andrological Classification of Bulls evaluated by Machine Learning

Silvio André Isler\*<sup>1</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>2</sup>, Ériklis Nogueira<sup>3</sup>, Vanessa Aparecida de Moraes Weber<sup>1</sup>, Felipe de Oliveira Pedro<sup>1</sup>, Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>, Daudyson Antonio Gonzalez Cordeiro<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>3</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>4</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil  
Rmail: \*islersilvio@gmail.com

The study was conducted with the aim of verifying the behavior of the classification of Andrological Exams (AE) of bulls used in natural mating through Machine Learning (ML). A database of AE of 2308 bulls was used, with the following attributes for each examination: region, breed, genotype, age class, testicular consistency, scrotal circumference, semen volume, sperm swirl, sperm motility, sperm vigor, acrosome defect, proximal cytoplasmic drop, head defect, midpiece defect, total major defects, distal cytoplasmic drop, normal isolated head, tail defects, total minor defects, total defects and total normal sperm. The classification of these animals for each test was made as fit (n = 1088), unfit (n = 672) and questionable (n = 548). This database was submitted to the ML tool Waikato Environment for Knowledge Analysis (WEKA) through its tool Auto Weka, which suggested the Random Forest algorithm, a collection of decision trees. ML was able to identify results similar to AE for most bulls, especially for animals classified as fit (94.1% - 1024/1088) and unfit (95.2% - 522/548). For animals classified as doubtful, the results of the ML matched those of the AE in only 59.5% (400/672) of the bulls. Thus, in general, 84% (1946/2308) of the bulls have the same results using ML or AE, with a mean absolute error of 0.1651 and a root mean square error of 0.2761. We concluded that ML can be used to assist andrologists in classifying the results of AE. Further studies could increase the accuracy and even determine which features best represent the classes in the final classification using ML.

**Keywords:** Andrological Exams, Natural Mating, Random Forest, WEKA.

**Acknowledgements:** To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Foundation for the Development of Education, Science and Technology in Mato Grosso do Sul (FUNDECT/SECTEI, process 16/2016).

## Parâmetros Espermáticos de felídeos neotropicais pré e pós criopreservação

Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2\*</sup>, Mônica Madrigal-Valverde<sup>6</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>3</sup>, Marcus Vinicius Galvão Loiola<sup>4</sup>, Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>7</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>8</sup>, Mateus Martins Rodrigues dos Santos<sup>5</sup>; Rodrigo Freitas Bittencout<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduando do curso de Medicina Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>2</sup>Pós-Graduando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal nos Trópicos da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>3</sup>Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>4</sup>Professores do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>5</sup>Programa de residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil; <sup>6</sup>Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Costa Rica; <sup>7</sup>IFBaiano, Senhor do Bomfim, BA; <sup>8</sup>Pós-Graduando em Medicina Veterinária UNESP, Botucatu, SP  
\*e-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

A eficiência reprodutiva pode ser considerada uma das mais importantes características na preservação dos animais ameaçados de extinção ou em situação de vulnerabilidade, por isso, a utilização das biotecnologias da reprodução é fundamental na conservação dessas espécies, sendo indispensável o conhecimento do ejaculado, uma vez que apresenta papel importante frente a eficiência das técnicas reprodutivas. O estudo teve como objetivo, avaliar o perfil do ejaculado de felídeos neotropicais, provenientes do Parque Zoobotânico Getúlio Vargas, Salvador, Bahia, Brasil antes e após o processo de criopreservação. Utilizou-se três machos adultos das seguintes espécies: um gato maracajá (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821), um gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*, Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) e uma onça-pintada (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) que foram contidos quimicamente com uma combinação de 0,1 mg/kg de cloridrato de medetomidina (1mg/ml Vetoquinol Orion Pharma, Grupo Orion, Itália) e 5 mg/kg de cetamina (10% Syntec, Tecnologia Farmacêutica Aplicada à Medicina Veterinária, São Paulo, Brasil). O prepúcio e o pênis foram lavados com solução salina estéril e um cateter uretral estéril de tomcat (13cm x 1mm, Provar Ltda, São Paulo, Brasil) foi introduzido na uretra peniana até 7 cm, 20 minutos após a indução farmacológica. A colheita de uma amostra de cada animal foi realizada através do estímulo digital da próstata pelo reto e com uma seringa de 1 mL foi acoplada no cateter, realizando pressão negativa para aumentar a sucção. Após a colheita, a anestesia foi revertida pela administração de 0,25 mg/kg antipamezol (4,28 mg/ml, Vetoquinol Orion Pharma, Grupo Orion, Itália). O volume obtido de sêmen foi então diluído em meio à base de gema de ovo TRIS em tubo de polipropileno (1,5 mL), mantido em banho-maria a 37°C e avaliado. Procedeu-se para etapa de criopreservação espermática, onde amostras seminais de cada animal, foram diluídas em meio base contendo o Tris-gema de ovo com adição de 6% de glicerol como crioprotetor. A descongelação do sêmen ocorreu a 37°C, por 30 segundos. Os parâmetros espermáticos pré e pós-congelamento foram avaliados por meio da análise subjetiva, quanto ao vigor espermático, motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), índice de motilidade espermática (SMI) integridade estrutural (EOS) e funcional da membrana plasmática (CH) e morfologia espermática. O volume e concentração espermática foram avaliadas apenas no sêmen *in natura*. A amostra seminal da *Panthera onca* sofreu contaminação externa, não sendo possível realizar a etapa de criopreservação. Os valores de parâmetros seminais estimados por microscopia convencional de amostras de felídeos silvestres *in natura* e pós-descongelamento foram, respectivamente: *Leopardus wiedii* (Volume:20µL e Concentração: 120X10<sup>6</sup>/mL): Vigor (1-5) 4,00/ 1,00/ MT (%) 90,00/20,00; MP (%) 80,00/ 10,00; SMI 85,00/20,50; EOS (%) 63,00 / 22,00; CH (%) 81,00 / 90,00; Anomalias espermáticas Totais (%) 7,00 / 30,00; Anomalias espermáticas Menores (%) 7,00 / 9,00; Anomalias espermáticas Maiores (%) 5,00 / 21,00. *Puma yagouaroundi* (Volume:20µL e Concentração: 570X10<sup>6</sup>/mL): Vigor (1-5) 3,00 / 1,00. MT (%) 60,00 / 20,00. MP (%) 50,00 / 10,00; SMI 55,00 / 20,50; EOS (%) 63,00 / 53,00; CH (%) 88,00 / 70,00; Anomalias espermáticas Totais (%): 31,00 / 54,00; Anomalias espermáticas Menores (%) 26,00 / 15,00; Anomalias espermáticas Maiores (%) 5,00 / 35,00. *Panthera onca* (Volume:700µL): Volume (µl)700,00; Vigor (1-5) 1,00; MT (%) 20,00; MP (%) 5,00; SMI 12,50; EOS (%) 78,00; CH (%)86,00; Anomalias espermáticas Totais (%) 26,00; Anomalias espermáticas Menores (%) 7,00; Anomalias espermáticas Maiores (%) 19,00. Foi possível comprovar a eficiência da colheita uretral de sêmen em felídeos silvestres, tanto de pequeno quanto de grande porte. Os dados apresentados descrevem os parâmetros espermáticos de espécies de felídeos neotropicais, não sendo encontradas referências na literatura consultada, podendo ser o primeiro estudo a relatar os parâmetros seminais de *P. yagouaroundi* e o primeiro a relatar a colheita de sêmen uretral em *L. wiedii*.

**Palavras-chave:** Sêmen, *Panthera onca*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus wiedii*.

## Sperm parameters of pre- and post-cryopreservation neotropical felids

Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2\*</sup>, Mônica Madrugal-Valverde<sup>6</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>3</sup>, Marcus Vinicius Galvão Loiola<sup>4</sup>, Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>7</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>8</sup>, Mateus Martins Rodrigues dos Santos<sup>5</sup>; Rodrigo Freitas Bittencout<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduating from the Veterinary Medicine course of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>2</sup>Postgraduate of the Postgraduate Program in Animal Science in the Tropics of EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>3</sup>Veterinary Doctor of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>4</sup>Teachers of the course of Veterinary Medicine of EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>5</sup>Residency Program in Reproduction and Veterinary Obstetrics of EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>6</sup>Technological Institute of Costa Rica, San Carlos, Costa Rica; <sup>7</sup>IFBaiano, Senhor do Bomfim, BA; <sup>8</sup>Postgraduate in Veterinary Medicine, UNESP, Botucatu, SP  
 \*E-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

Reproductive efficiency can be considered one of the most essential characteristics in preserving animals threatened with extinction or in a situation of vulnerability. Therefore, the use of reproductive biotechnologies is fundamental in conserving these species, and knowledge of the ejaculate is indispensable since it plays a vital role in the efficiency of reproductive techniques. The study aimed to evaluate the profile of the ejaculate of neotropical felids from the Getúlio Vargas Zoobotânico Park, Salvador, Bahia, Brazil, before and after the cryopreservation process. Three adult males of the following species were used: a maracajá cat (*Leopardus wiedii*, Schinz, 1821), a Moorish cat (*Puma yagouaroundi*, Geoffroy Saint-Hilaire, 1803) and a jaguar (*Panthera onca*, Linnaeus, 1758) that were chemically contained with a combination of 0.1 mg/kg of medetomidine hydrochloride (1mg/ml Vetoquinol Orion Pharma, Orion Group, Italy) and 5 mg/kg of ketamine (10% Syntec, Pharmaceutical Technology Applied to Veterinary Medicine, São Paulo, Brazil). The foreskin and penis were washed with sterile saline solution, and a sterile tomcat urethral catheter (13cm x 1mm, Provar Ltda, São Paulo, Brazil) was introduced into the penile urethra up to 7 cm, 20 minutes after pharmacological induction. The collection of a sample of each animal was performed through the digital stimulation of the prostate through the rectum, and a 1 mL syringe was coupled to the catheter, performing negative pressure to increase the suction. After harvest, anesthesia was reversed by administering 0.25 mg/kg antipamezol (4.28 mg/ml, Vetoquinol Orion Pharma, Orion Group, Italy). The volume obtained of semen was then diluted in a TRIS egg yolk-based medium in a polypropylene tube (1.5 mL), kept in a water bath at 37°C, and evaluated. We proceeded to the sperm cryopreservation stage, where seminal samples of each animal were diluted in a base medium containing the egg tris-yolk with the addition of 6% glycerol as a cryoprotective. The defrosting of the semen occurred at 37°C for 30 seconds. The pre-and post-freezing sperm parameters were evaluated through subjective analysis for sperm vigor, total motility (MT), progressive motility (MP), sperm motility index (SMI), structural (EOS), and functional integrity of the plasma membrane (CH), and sperm morphology. Sperm volume and concentration were evaluated only in fresh semen. The seminal sample of *Panthera onca* suffered external contamination, and it was impossible to perform the cryopreservation step. The values of seminal parameters estimated by conventional microscopy of samples of wild felines *in nature* and post-thawing were, respectively: *Leopardus wiedii* (Volume:20µL and Concentration: 120X106/mL): Vigor (1-5) 4.00/ 1.00/ MT (%) 90.00/20.00; MP (%) 80.00/ 10.00; SMI 85.00/20.50; EOS (%) 63.00 / 22.00; CH (%) 81.00 / 90.00; Total Sperm Anomalies (%) 7.00 / 30.00; Minor Sperm Anomalies (%) 7.00 / 9.00; Major Sperm Anomalies (%) 5.00 / 21.00. *Puma yagouaroundi* (Volume:20µL and Concentration: 570X106/mL): Vigor (1-5) 3.00 / 1.00. MT (%) 60.00 / 20.00. MP (%) 50.00 / 10.00; SMI 55.00 / 20.50; EOS (%) 63.00 / 53.00; CH (%) 88.00 / 70.00; Total Sperm Anomalies (%): 31.00 / 54.00; Minor Sperm Anomalies (%) 26.00 / 15.00; Major Sperm Anomalies (%) 5.00 / 35.00. *Panthera onca* (Volume:700µL): Volume (µl)700.00; Vigor (1-5) 1.00; MT (%) 20.00; MP (%) 5.00; SMI 12.50; EOS (%) 78.00; CH (%)86.00; Total Sperm Anomalies (%) 26.00; Smaller Sperm Anomalies (%) 7.00; Major Sperm Anomalies (%) 19.00. It was possible to prove the efficiency of the urethral collection of semen in small and large wild felids. The data presented describe the sperm parameters of neotropical felid species, and no references were found in the literature consulted. It may be the first study to report the seminal parameters of *P. yagouaroundi* and the first to report the collection of urethral semen in *L. wiedii*.

**Keywords:** Semen, *Panthera onca*, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus wiedii*.

## Implicações da bipartição escrotal e prega caudal em touros: relato de casos

Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Rafael Reis Iapichini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Docente-Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil\*; <sup>2</sup>Discente – Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil.

\*eduardorossi@professor.faeff.edu.br

O exame clínico andrológico minucioso, é fundamental para prever o potencial de fertilidade de um reprodutor. Durante o exame em touros, é possível observar diferenças morfológicas nos escrotos e testículos entre zebuínos e taurinos. Tais mudanças devem-se à necessidade de adaptações para climas tropicais e subtropicais onde a temperatura é mais elevada, como a parcial divisão do escroto, relacionada a termorregulação. Em associação com outras espécies, foram notadas variações morfológicas em caprinos do nordeste brasileiro, cujos escrotos bipartidos, com maior área da superfície escrotal, revelaram vantagens na qualidade e quantidade espermática e na eficiência reprodutiva. Acredita-se que tais resultados estão relacionados ao maior número de glândulas sudoríparas que exercem função de regulação da temperatura testicular, que deve permanecer entre 2 e 6 graus Celsius inferior a temperatura corporal. Desta forma, o presente relato visa descrever alterações morfológicas encontradas no escroto de touros da raça Gir (n=1) e Jersey (n=2) de 2,5 anos de idade. Tais animais foram mantidos em regime de colheita de sêmen 1 vez por semana pelo método de vagina artificial durante 2 meses. Destes animais, o da raça Gir apresentou bipartição a direita de 3.3cm e esquerda de 4.2cm (distância entre a rafe medial de escroto e cauda de epididimo), presença de prega caudal do lado direito de escroto e testículos assimétricos (comprimento, altura e largura), sendo o direito 11.3x6x6.1 cm e esquerdo 8.9x6x5.8 cm, rotacionados para a direita e mais deslocados proximalmente. Enquanto 2 touros Jersey (A e B) de 32cm e 31cm de circunferência escrotal respectivamente, apresentaram: touro A - prega caudal do lado direito, testículo direito com 12,1x5,2x6 cm e esquerdo 11,1x6x6,3 cm e o touro B - no qual o testículo direito apresentava 12,1x6x5,9 cm e o esquerdo (com prega caudal) 11,3x6x6,3 cm. Apesar das alterações morfológicas encontradas no escroto, não foi observado comprometimento na qualidade e quantidade espermática nestes animais. Em conclusão, a bipartição escrotal não provocou prejuízos a espermatogênese. No entanto, a persistência da prega caudal em escroto associada com rotação escrotal para a esquerda ou direita, que, a depender da intensidade, gera preocupações a longo prazo quanto a eficiência reprodutiva.

**Palavras-chave:** Bovinos, Morfologia Escrotal, Eficiência Reprodutiva.

**Agradecimentos:** À Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral – FAEF, mantida pela Sociedade Cultural e Educacional de Garça por ceder os animais e espaço para realização da pesquisa.

## Implications of scrotal bipartition and caudal fold in bulls: case reports

Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Rafael Reis Iapichini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Docente-Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil\*; <sup>2</sup>Discente – Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil  
\*eduardorossi@professor.faeff.edu.br

A thorough clinical andrological examination is essential for predicting a sire's fertility potential. During the examination of bulls, it is possible to observe morphological differences in the scrotums and testicles between zebu and taurine bulls. These changes are due to the need to adapt to tropical and subtropical climates where temperatures are higher, such as the partial division of the scrotum, related to thermoregulation. In association with other species, morphological variations were noted in goats from northeastern Brazil, whose bipartite scrotums, with a larger scrotal surface area, revealed advantages in sperm quality and quantity and in reproductive efficiency. It is believed that these results are related to the greater number of sweat glands that regulate testicular temperature, which should remain between 2 and 6 degrees Celsius below body temperature. This report aims to describe the morphological changes found in the scrotum of 2.5-year-old Gir (n=1) and Jersey (n=2) bulls. Of these animals, the Gir bull showed a right-sided bipartition of 3.3 cm and a left-sided bipartition of 4.2 cm (distance between the medial raphe of the scrotum and the cauda of the epididymis), the presence of a caudal fold on the right side of the scrotum and asymmetrical testicles (length, height and width), the right testicle being 11.3x6x6.1 cm and the left testicle 8.9x6x5.8 cm, rotated to the right and more proximally displaced. While 2 Jersey bulls (A and B) with a scrotal circumference of 32 cm and 31 cm respectively, had: bull A - a caudal fold on the right side, a right testicle measuring 12.1x5.2x6 cm and a left testicle measuring 11.1x6x6.3 cm and bull B - in which the right testicle was 12.1x6x5.9 cm and the left testicle (with caudal fold) 11.3x6x6.3 cm. Despite the morphological changes found in the scrotum, no impairment in sperm quality or quantity was observed in these animals. In conclusion, scrotal bipartition did not harm spermatogenesis. However, the persistence of the caudal fold in the scrotum associated with scrotal rotation to the left or right, which, depending on the intensity, raises long-term concerns about reproductive efficiency.

**Keywords:** cattle, scrotal morphology, reproductive efficiency.

**Acknowledgments:** To the Faculty of Higher Education and Integral Training - FAEF, maintained by the Cultural and Educational Society of Garça, for providing the animals and space to carry out the research.



## Fertilidade do sêmen refrigerado ou congelado em fêmeas Nelore submetidas a um programa de sincronização da ovulação

**Artur Azevedo Menezes<sup>1</sup>, Alexandra Soares Rodrigues<sup>2</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>1</sup>; Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>1</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB), Barra, BA, Brasil

e-mail: arturmenezes@ufba.br

A utilização da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) cresce a cada ano no Brasil, bem como o número de pesquisas nessa área. Nesse contexto, existem muitos fatores que influenciam a taxa de prenhez e a viabilidade espermática é um deles. Com o intuito de aumentar a viabilidade, é utilizada a técnica de criopreservação do sêmen. Entretanto, há grande perda de células espermáticas durante o processo. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar a utilização de sêmen refrigerado ou congelado sobre a fertilidade de fêmeas Nelore submetidas a um protocolo de IATF. Para tanto, foram utilizadas 731 multíparas Nelore (idade =  $8,9 \pm 0,18$  anos; ECC =  $2,8 \pm 0,01$ ; dias pós-parto =  $67,2 \pm 1,05$ ) sincronizadas com o seguinte protocolo hormonal: no dia 0 (D0), os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona de 0,5 g associado a 2 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (IM). No D8, retirou-se o dispositivo intravaginal de P4 e foram aplicados 300 UI de gonadotrofina coriônica equina IM, 520 µg de cloprostenol sódico IM e 1 mg de cipionato de estradiol IM. No dia 10, os animais foram separados, aleatoriamente, em dois grupos experimentais: grupo Sêmen Refrigerado (209 animais) – animais inseminados com sêmen refrigerado (15° C) utilizando um diluidor comercial (BotuBOV) e grupo Sêmen Congelado (522 animais) – sêmen congelado comercial de uma central de reprodução. O diagnóstico de gestação foi realizado por exame ultrassonográfico no dia 40 (D40). As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software R, utilizando o pacote STATS (2023), e considerou-se nível de significância 5%. A taxa de prenhez geral foi de 61,3% (448/731). A taxa de prenhez do grupo Sêmen Refrigerado foi de 69,9% (146/209), sendo essa superior ( $P=0,003$ ) a taxa de prenhez do grupo Sêmen Congelado, o qual apresentou uma taxa de prenhez de 57,8% (302/522). Dessa forma, o sêmen resfriado pode ser utilizado como ferramenta para incrementar os índices reprodutivos em programas de sincronização da ovulação.

**Palavras chaves:** Criopreservação; Sêmen refrigerado, IATF, gado de corte.

## Fertility of cooled or frozen semen in Nelore females subjected to an ovulation synchronization program

Artur Azevedo Menezes<sup>1</sup>, Alexandra Soares Rodrigues<sup>2</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Galvão Loiola<sup>1</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>1</sup>, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>1</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Veterinary Medicine and Zootecnics, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brazil.

<sup>2</sup>Federal University of Western Bahia (UFOB), Barra, BA, Brazil.

e-mail: arturmenezes@ufba.br

The utilization of Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) is increasing annually in Brazil, alongside the rise in research within this field. Within this context, numerous factors influence pregnancy rates, and sperm viability is one of them. With the aim of enhancing viability, semen cryopreservation technique is employed. However, there is significant sperm cell loss during this process. Thus, the objective of this study was to evaluate the use of cooled or frozen semen on the fertility of Nelore females subjected to an FTAI protocol. For this purpose, 731 multiparous Nelore cows (age =  $8.9 \pm 0.18$  years; BCS =  $2.8 \pm 0.01$ ; days postpartum =  $67.2 \pm 1.05$ ) were synchronized using the following hormonal protocol: on day 0 (D0), animals received a 0.5 g intravaginal progesterone-releasing device associated with 2 mg of intramuscular (IM) estradiol benzoate. On day 8, the intravaginal progesterone device was removed, and 300 IU of IM equine chorionic gonadotropin, 520 µg of IM cloprostenol sodium, and 1 mg of IM estradiol cypionate were administered. On day 10, the animals were randomly assigned to two experimental groups: Cooled Semen Group (209 animals) – animals inseminated with cooled semen (15°C) using a commercial diluent (BotuBOV), and Frozen Semen Group (522 animals) – commercial frozen semen from a reproduction center. Pregnancy diagnosis was performed via ultrasonographic examination on day 40 (D40). Statistical analyses were conducted using R Software, employing the STATS package (2023), considering a significance level of 5%. The overall pregnancy rate was 61.3% (448/731). The pregnancy rate in the Cooled Semen Group was 69.9% (146/209), which was higher ( $P = 0.003$ ) than the pregnancy rate in the Frozen Semen Group, which presented a pregnancy rate of 57.8% (302/522). Thus, cooled semen can be utilized as a tool to enhance reproductive indices in ovulation synchronization programs.

**Keywords:** Cryopreservation; Cooled semen; FTAI; Beef cattle

## Perfil do sêmen criopreservado de touros Pantaneiro após o descongelamento

Silvio André Isler\*<sup>1</sup>, Aracy Garcia Travassos dos Santos<sup>1</sup>, Dauydisson Antônio Gonzalez Cordeiro<sup>3</sup>, Felipe de Oliveira Pedro<sup>1</sup>, Wilian Aparecido Leite da Silva<sup>1</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>2</sup>, Marcus Vinícius Morais de Oliveira<sup>1</sup>, Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>, Marco Antonio Carstens Mendonça<sup>4</sup>, Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>4</sup>Reprotec, Campo Grande, MS, Brasil.

\*e-mail: islersilvio@gmail.com

O gado Pantaneiro, que atualmente encontra-se em risco de extinção, é resultante de bovinos trazidos ao país no século XVI e submetidos à seleção natural nas condições de Pantanal. A raça apresenta alta adaptação às condições climáticas, sanitárias e nutricionais, sendo atualmente considerada autóctone do Bioma Pantanal e de interesse em conservação de seu material genético. Desde 2007, uma equipe multidisciplinar e multistitucional, visa o resgate, melhoramento genético e multiplicação dos animais pantaneiros, com fundamental uso das biotecnologias da reprodução animal. Para tal, tem-se buscado selecionar indivíduos fenotipicamente caracterizados como da raça e criar um banco genético de gametas masculinos e femininos dessa população. Este estudo teve por objetivo traçar o perfil seminal de touros pantaneiros, valendo-se do material do banco de sêmen criopreservado da UEMS, oriundo de 11 animais pertencentes à Embrapa Pantanal, Fazenda Rio Negro e UEMS. As amostras seminais foram analisadas no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), contemplando as características físicas (após o descongelamento e pelo Teste de Termo Resistência Rápido (TTR)), características morfológicas, integridade de membrana (em corante supravital eosina-nigrosina - Botupharma<sup>®</sup>) e a cinética espermática analisada pelo Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; Hamilton Thorn Ivos II<sup>®</sup>). Os dados foram submetidos à estatística descritiva para caracterizar a resposta da raça ao processo de criopreservação em palheta média, com diluente Botubov<sup>®</sup>. Os perfis médios obtidos foram: motilidade progressiva = 27,73±3,25%; vigor = 2,82±0,22; células com membrana íntegra por dose = 10,25±2,51x10<sup>6</sup>; defeitos maiores (DMA) = 13,36±2,63%; defeitos menores = 11,36±1,07%; defeitos totais = 27,73±2,85%; espermatozoides normais = 75,27±2,85%; espermatozoides vivos com membrana íntegra = 51,45±6,08%. Após análise de TTR obteve-se: motilidade (MotTTR) = 23,64±4,91% e vigor = 2,50±0,26. As análises pelo CASA resultaram em: motilidade total = 24,77±5,58%; motilidade progressiva (MotP) = 13,88±3,09%, concentração espermática = 48,7±11,0x10<sup>6</sup> (espermatozoides/dose), concentração de espermatozoides viáveis = 5,01±1,7x10<sup>6</sup> (espermatozoides viáveis/dose); subpopulação de espermatozoides hiperativos = 3,60±1,36x10<sup>6</sup> (espermatozoides/dose); subpopulação lenta = 1,42±0,42x10<sup>6</sup> (espermatozoides/dose), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) = 7,97±0,87µm, linearidade (LIN) = 39,50±4,18%; retilinearidade (STR) = 70,38±7,18%; velocidade de trajeto (VAP) = 90,70±9,49 µm/s; velocidade curvilínea (VCL) = 174,48±18,67µm/s; velocidade retilínea (VSL) = 68,16±7,08µm/s; índice de oscilação (WOB) = 49,66±5,06Hz. Diante das avaliações 5 partidas foram consideradas satisfatórias e 6 insatisfatórias, de acordo com os parâmetros sugeridos pelo CBRA. De acordo com as equações de previsibilidade de taxa de concepção (TC) pós Inseminação artificial em tempo fixo usando os parâmetros do CASA (TC% = 9,788 + (0,2 MotP) + (0,289 VAP) + (0,179 VSL)) ou os subjetivos (TC% = 49,781 + (0,243 MotTTR) - (0,483 DMA)), as previsões médias foram de 50,99 ±4,29 e de 49,07±1,51 %, respectivamente, mesmo alguns animais tendo apresentado maus resultados após descongelamento. Portanto, os resultados obtidos servirão de base para o desenvolvimento de estratégias de criopreservação e conservação mais adequados e eficientes para a raça.

**Palavras-chave:** biotecnologias da reprodução, conservação, material genético, raças adaptadas.

**Agradecimentos:** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação para o Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia em Mato Grosso do Sul (FUNDECT/SECTEI, processo 16/2016).

## Profile of cryopreserved semen from Pantaneiro bulls after thawing

Silvio André Isler<sup>\*1</sup>, Aracy Garcia Travassos dos Santos<sup>1</sup>, Dauydisson Antonio Gonzalez Cordeiro<sup>3</sup>, Felipe de Oliveira Pedro<sup>1</sup>, Wilian Aparecido Leite da Silva<sup>1</sup>, Urbano Gomes Pinto de Abreu<sup>2</sup>, Marcus Vinícius Morais de Oliveira<sup>1</sup>, Fabiana de Andrade Melo Sterza<sup>1</sup>, Marco Antonio Carstens Mendonça<sup>4</sup>, Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>4</sup>Reprotec, Campo Grande, MS, Brasil.

\*e-mail: islersilvio@gmail.com

Pantaneiro cattle, which are currently at risk of extinction, are the result of cattle brought over to country in the 16th century and subjected to natural selection in the Pantanal. The breed is highly adaptable to climatic, health and nutritional conditions, and is currently considered autochthonous to the Pantanal Biome and of interest in the conservation of its genetic material. Since 2007, a multidisciplinary and multi-institutional team has been working to rescue, genetically improve and multiply Pantaneiro animals, making fundamental use of animal reproduction biotechnologies. To this purpose, the aim has been to select individuals phenotypically characterized as being of the breed and to create a genetic bank of male and female gametes from this population. The aim of this study was to outline the seminal profile of Pantanal bulls, using material from the UEMS cryopreserved semen bank from 11 animals belonging to Embrapa Pantanal, Fazenda Rio Negro and UEMS. The seminal samples were analyzed at the Animal Reproduction Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics (FAMEZ) of the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), covering physical characteristics (after thawing and by the Rapid Thermal Resistance Test (TRT)), morphological characteristics, membrane integrity (in supravital eosin-nigrosin dye - Botupharma<sup>®</sup>) and sperm kinetics analyzed by Computer Assisted Sperm Analysis (CASA; Hamilton Thorn Ivos II<sup>®</sup>). The data was submitted to descriptive statistics to characterize the breed's response to the cryopreservation process in medium straw, with Botubov<sup>®</sup> diluent. The average profiles obtained were: progressive motility = 27.73±3.25%; vigor = 2.82±0.22; cells with intact membranes per dose = 10.25±2.51x10<sup>6</sup>; major defects (DMa) = 13.36±2.63%; minor defects = 11.36±1.07%; total defects = 27.73±2.85%; normal sperm = 75.27±2.85%; live sperm with intact membranes = 51.45±6.08%. After TRT analysis, motility (MotTRT) = 23.64±4.91% and vigor = 2.50±0.26 were obtained. Analysis by CASA resulted in: total motility = 24.77±5.58%; progressive motility (MotP) = 13.88±3.09%, sperm concentration = 48.7±11.0x10<sup>6</sup> (sperm/dose), viable sperm concentration = 5.01±1.7x10<sup>6</sup> (viable sperm/dose); hyperactive sperm subpopulation = 3.60±1.36x10<sup>6</sup> (sperm/dose); slow subpopulation = 1.42±0.42x10<sup>6</sup> (sperm/dose), lateral head displacement amplitude (ALH) = 7.97±0.87µm, linearity (LIN) = 39.50±4.18%; retilinearity (STR) = 70.38±7.18%; path velocity (VAP) = 90.70±9.49 µm/s; curvilinear velocity (VCL) = 174.48±18.67µm/s; rectilinear velocity (VSL) = 68.16±7.08µm/s; oscillation index (WOB) = 49.66±5.06Hz. From the evaluations, 5 samples were considered satisfactory and 6 unsatisfactory, according to the parameters suggested by the CBRA. According to the predictive equations for conception rate (CR) after fixed-time artificial insemination using the CASA parameters (CR% = 9.788 + (0.2 MotP) + (0.289 VAP) + (0.179 VSL)) or the subjective ones (CR% = 49.781 + (0.243 MotTRT) - (0.483 DMa)), the average predictions were 50.99 ±4.29 and 49.07±1.51 %, respectively, even though some animals showed poor results after thawing. Therefore, the results obtained will provide the basis for the development of more appropriate and efficient cryopreservation and conservation strategies to this breed.

**Keywords:** reproductive biotechnologies, conservation, genetic material, adapted breeds.

**Acknowledgements:** To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Foundation for the Development of Education, Science and Technology in Mato Grosso do Sul (FUNDECT/SECTEL, process 16/2016).