

## Microlitíase testicular em um cão – relato de caso

Silvia Edelweiss Crusco<sup>1,2</sup> Antonio Carlos Dertonio Donato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mirai Centro de Diagnóstico Veterinário – Vargem Grande Paulista – São Paulo – Brasil

<sup>2</sup>Universidade Paulista – UNIP – São Paulo – Brasil

<sup>3</sup>Anclivepa-SP

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

**Introdução e objetivo:** A microlitíase testicular é uma condição patológica incomum que é diagnosticada por ultrassonografia escrotal. Evidências indiretas sugerem que esta alteração pode estar associada a um aumento do risco de malignidade testicular e infertilidade. Este relato de caso descreve uma microlitíase testicular em um cão. **Relato de caso:** Fomos chamados para fornecer uma segunda opinião sobre o estado reprodutivo de um cão, com 2 anos de idade, da raça Boiadeiro Bernês, importado da Europa Oriental. O objetivo da consulta foi para realizar uma nova avaliação seminal, pois ele seria usado como reprodutor. O animal estava alimentado com ração comercial e sem histórico de medicação que pudesse alterar a espermatogênese antes do exame. **Resultados:** Após um exame físico completo, foi realizada coleta de sêmen para uma nova avaliação seminal. Ele continuou apresentando as alterações seminais observadas no exame inicial: astenozoospermia, oligospermia e teratospermia. Devido a este resultado, foi iniciada uma pesquisa para verificar estas alterações seminais. Um painel de DNA (Iddex Abortion RealPCR™ Panel - Canine) foi realizado para *Brucella canis*, *Campylobacter jejuni*, Herpesvírus Canino - CHV1, *Leishmania* spp, *Leptospira* spp., *Neospora* spp., Parvovírus 1 (vírus minuto), *Salmonella* Spp. e *Leishmania* spp. e *Toxoplasma gondi* com resultados negativos. Ao realizar ultrassonografia dos órgãos do sistema reprodutivo, foi diagnosticada próstata bilobada, com contornos regulares, parênquima homogêneo e ecogenicidade normal, medindo aproximadamente 3,42cm no eixo craniocaudal, 3,49cm no eixo dorsoventral e 3,92cm no eixo laterolateral. Testículos simétricos (esquerdo: 4,12cm x 1,79cm e direito: 4,26cm x 1,90cm), ambos com contornos regulares, linha mediastinal bem definida, parênquima levemente heterogêneo com algumas imagens pontuais hiperecoicas dispersas e ecogenicidade normal (áreas de fibrose/mineralização). Epidídimo e plexo pampiniforme sem alterações ultrassonográficas. Diagnóstico de microlitíase testicular. A avaliação seminal após a primeira foi: volume 4ml, aspecto de leite desnatado, motilidade progressiva dos espermatozoides 40%, velocidade de propulsão (vigor) 2 (0-5), defeitos menores 11% (cabeça destacada 2%, cauda enrolada 5% e cauda dobrada 4%) e defeitos maiores 54% (cauda fortemente dobrada 4%, cauda dobrada reflexa 50%) totalizando 75% de defeitos. A concentração de espermatozoides foi de 89 x 10<sup>6</sup> ml (350 x 10<sup>6</sup> total). Após o diagnóstico, o criador nos informou que este macho vem de um histórico de infertilidade familiar. A recomendação foi retirar o animal da reprodução; no entanto, o criador insistiu em mantê-lo, e outro veterinário realizou a inseminação de duas fêmeas resultando no nascimento de 1 filhote macho de uma fêmea e dois filhotes, um macho e uma fêmea, de outra fêmea. Este cão reprodutor foi eventualmente diagnosticado com tumor de mastócitos no escroto e foi castrado. **Conclusão:** A microlitíase não é considerada um fator de risco independente, mas tem sido associada a várias condições testiculares em homens e cães, incluindo neoplasias e infertilidade. Neste relatório de caso, podemos associar a microlitíase testicular com a posterior presença de neoplasia, bem como o provável elo hereditário desta alteração. Há também o aspecto ético do cão ser mantido como reprodutor apesar de ser aconselhado o contrário. **Referências:** [1] McEvoy FJ, Panida Pongvittayanon, Vedel T, Holst P, Müller AV. A survey of testicular texture in canine ultrasound images. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023 Aug 11;10. [2] Yee WS, Kim YS, Kim SJ, Choi JB, Kim SI, Ahn HS. Testicular Microlithiasis: Prevalence and Clinical Significance in a Population Referred for Scrotal Ultrasonography. *Korean Journal of Urology*. 2011;52(3):172.

**Palavras-chave:** testículos, microlitíase, infertilidade, mastocitoma

## Testicular microlithiasis in a dog – Case report

Silvia Edelweiss Crusco<sup>1,2,3</sup> Antonio Carlos Dertonio Donato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mirai Centro de Diagnóstico Veterinário – Vargem Grande Paulista – São Paulo – Brasil

<sup>2</sup>Universidade Paulista – UNIP – São Paulo – Brasil

<sup>3</sup>Anclivepa-SP

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

**Introduction and aim:** Testicular microlithiasis is an uncommon pathologic condition that is commonly diagnosed by scrotal ultrasonography. Indirect evidence suggests that this syndrome may be associated with an increased risk of testicular malignancy and infertility. This case report describes a testicular microlithiasis in a dog. **Case report:** We were called to provide a second opinion on the reproductive status of a dog, 2 years of age, Bernese Mountain Dog breed, imported from Eastern Europe. The purpose of the consultation was to perform a new seminal evaluation, as he would be used as a stud. Animal feeding commercial food and without a history of medication that could alter spermatogenesis before the examination. **Results:** After a complete physical examination, semen collection was performed for a new semen evaluation. He continued to have the seminal alterations observed in the initial examination: asthenozoospermia, oligospermia and teratospermia. Due to this result, research was initiated to verify these seminal alterations. A DNA panel (Iddex Abortion RealPCR™ Panel – Canine) was performed for *Brucella canis*, *Campylobacter jejuni*, *Canine Herpesvirus – CHV1*, *Leishmania spp.*, *Leptospira spp.*, *Neospora spp.*, Parvovirus 1 (minute virus), *Salmonella Spp.*, and *Leishmania spp.* and *Toxoplasma gondi* with negative results. Upon performing ultrasound of the reproductive system organs, Bilobed prostate was diagnosed, with regular contours, homogeneous parenchymal, and normal echogenicity, measuring approximately 3.42cm on the craniocaudal axis, 3.49cm on the dorsoventral axis, and 3.92cm in the laterolateral axis. Symmetric testicles (left: 4.12cm x 1.79cm and right: 4.26cm x 1.90cm), both showing regular contours, well-defined mediastinal line, slightly heterogeneous parenchymal with some scattered hyperechoic pinpoint images, and normal echogenicity (areas of fibrosis/mineralization). Epididymis and pampiniform plexus without ultrasonographic changes. Testicular microlithiasis diagnosis. Semen evaluation after the first was: volume 4ml, skimmed milk appearance, spermatozoa progressive motility 40%, velocity of propulsion (vigor) 2 (0-5), minor defects 11% (detached head 2%, coiled tail 5% and bent tail 4%) and major defects 54% (strongly bent tail 4%, reflex bent tail 50%) totalizing 75% defects. Sperm concentration was 89 x 10<sup>6</sup> ml (350 x 10<sup>6</sup> total). After the diagnosis, the breeder told us that this male has a familial infertility history. The recommendation was to remove the animal from reproduction; however, the breeder insisted on using him, and another veterinarian performed the insemination of two females resulting in the birth of 1 male puppy from one female and two puppies, one male and one female, from another female. This stud dog was eventually diagnosed with mast cell tumor in the scrotum and was castrated. **Conclusion:** Microlithiasis is not considered an independent risk factor but has been associated with several testicular conditions in men and dogs, including neoplasia and infertility [1,2]. In this case report, we can associate the testicular microlithiasis with the posterior presence of neoplasia as well as the probable hereditary link of this alteration. There is also the ethical aspect of the dog being kept as a stud despite being advised otherwise. **References** [1] McEvoy FJ, Panida Pongvittayanon, Vedel T, Holst P, Müller AV. A survey of testicular texture in canine ultrasound images. *Frontiers in Veterinary Science*. 2023 Aug 11;10. [2] Yee WS, Kim YS, Kim SJ, Choi JB, Kim SI, Ahn HS. Testicular Microlithiasis: Prevalence and Clinical Significance in a Population Referred for Scrotal Ultrasonography. *Korean Journal of Urology*. 2011;52(3):172.

**Keywords:** testicles, microlithiasis, infertility, mast cell tumor

## A relação da Doppler velocimetria da artéria testicular e análise seminal em padreadores da raça Spitz Alemão

**Bruno Alcântara Buzato<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Vinícius Wagner Silva<sup>1</sup>, Natália Ribeiro Sambatti<sup>1</sup>, Júlia Rodrigues Greggi<sup>1</sup>, Letícia Amanda dos Santos<sup>1</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida - LARAA, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Brasil  
E-mail: lgct@uel.br, imartins@uel.br

A raça Spitz Alemão atualmente tem apresentado grande interesse de quem procura cães para companhia. Portanto, é importante que pesquisas sejam conduzidas a fim de estabelecer exames complementares ao andrológico, para a escolha do melhor reprodutor. A ultrassonografia em modo-B é de suma importância na avaliação clínica do sistema reprodutivo, assim como o modo Doppler se mostrou uma notável ferramenta na avaliação da hemodinâmica testicular de cães. O objetivo deste estudo foi correlacionar a Doppler velocimetria da artéria testicular de cães da raça Spitz Alemão com as características da cinética e morfologia espermática. Foram avaliados dezoito cães reprodutores, da raça Spitz Alemão, com idades entre 2 a 8 anos e peso médio de 3,2 kg, pertencentes a um canil comercial. Foi realizada ultrassonografia (US) testicular em modo-B para avaliação de ecogenidade, ecotextura e presença de degeneração mediastinal. A avaliação Doppler foi realizada em cinco regiões da artéria testicular (suprtesticular proximal, média e distal, marginal e intratesticular) e as variáveis velocidade de pico sistólico (VPS, cm/s), velocidade diastólica final (VDF, cm/s), índice de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP) foram aferidas. A cinética espermática do ejaculado (colhido por manipulação digital) foi analisada no sistema CASA pelo *setup* para cães (IVOS II, Hamilton Thorne, USA). A morfologia espermática e integridade de membrana foram avaliadas por eosina/nigrosina. Para a comparação entre as variáveis US em modo-B e as variáveis cinética, integridade de membrana e morfologia espermática foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para correlação das variáveis quantitativas de US Doppler da artéria testicular e cinética espermática foi utilizado o teste de correlação de Pearson, ambos com nível de significância de 5%. As análises para cada testículo foram individualizadas em cada US (n = 36 testículos); em relação às avaliações do ejaculado (cinética, integridade de membrana e morfologia espermática) os resultados foram repetidos para os testículos esquerdo e direito. Ejaculados de cães com testículos hipocogênicos em relação ao mediastino (26/36) apresentaram maior integridade de membrana espermática (98%) que os com testículos isocogênicos (10/36; 95%). Quando comparados cães com testículos heterogêneos (4/36) e homogêneos (32/36) com a análise espermática, houve diferença entre as variáveis integridade de membrana (95% vs 98%), motilidade total (55% vs 76%), porcentagem de espermatozoides rápidos (39,5% vs 64,5%), lentos (38% vs 22%) e estáticos (7% vs 3%). Nove testículos (cinco cães) apresentaram algum grau de degeneração mediastinal e não houve diferença em relação às variáveis de cinética, morfologia ou integridade da membrana espermática, embora seja possível notar uma tendência nas variáveis motilidade progressiva (37% vs 44%; p = 0,082), VAP (92,8  $\mu$ m/s vs 108,8  $\mu$ m/s; p = 0,076), VSL (70  $\mu$ m/s vs 86,5  $\mu$ m/s; p = 0,065) e SMI (301,5 vs 335,8; p = 0,089). Houve diferença em relação à análise Doppler velocimétrica nas cinco regiões. Nas regiões suprtesticular distal, marginal e intratesticular foi observado um padrão parabólico de baixa resistividade; nas regiões suprtesticular média e proximal, foi observado um padrão semiparabólico de resistividade intermediária a alta, com pico sistólico agudo e baixa velocidade diastólica. Houve correlações negativas entre o PSV e a IR de diversas regiões da artéria testicular, especialmente na região intratesticular, com variáveis como a motilidade total (PSV: r = -0,64; RI: r = -0,47); porcentagem de espermatozoides rápidos (PSV: r = -0,61; RI: r = -0,52); lentos (PSV: r = 0,58; RI: r = 0,49); e retilinearidade (PSV: r = 0,49; RI: r = 0,5). A análise da ecotextura testicular revelou que testículos com ecotextura heterogênea estão associados com pior qualidade espermática, sugerindo um vínculo entre a uniformidade do tecido testicular e a produção espermática, como a presença de processos patológicos como a degeneração testicular, que afetam a ecotextura e, conseqüentemente, a função reprodutiva. Embora animais que tenham apresentado testículos isocogênicos em relação ao mediastino tenham apresentado pior integridade de membrana espermática, não houve animais com testículos hipercogênicos, característicos de cães inférteis. No presente trabalho foi notório que houve uma tendência na diminuição do movimento espermático em cães com mediastinos degenerados. As correlações negativas entre a motilidade e as variáveis Doppler velocimétricas evidenciaram a necessidade da redução da velocidade sanguínea ao adentrar ao testículo, especialmente devido à baixa resistência vascular no parênquima do órgão. Todavia, esse balanço deve seguir uma importante homeostase, caso contrário, velocidades muito baixas podem também ser deletérias, visto que foram identificadas correlações negativas entre a VPS e IR na região intratesticular e a motilidade total e a porcentagem de espermatozoides rápidos. Acredita-se que essa seja a região mais sensível para a avaliação do fluxo sanguíneo testicular, visto que é a responsável pela irrigação do parênquima. Conclui-se que os valores Doppler velocimétricos da artéria testicular estão correlacionados com a cinética espermática, portanto, a ultrassonografia em modo-B e Doppler são importantes exames na seleção de reprodutores da raça Spitz Alemão.

**Palavras-chave:** Doppler pulsado, reprodutores, caninos, exame andrológico, ultrassonografia modo-B

## The relationship between testicular artery Doppler velocimetry and seminal analysis in German Spitz dogs

**Bruno Alcântara Buzato<sup>1</sup>, Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Vinícius Wagner Silva<sup>1</sup>, Natália Ribeiro Sambatti<sup>1</sup>, Júlia Rodrigues Gregghi<sup>1</sup>, Letícia Amanda dos Santos<sup>1</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida - LARAA, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.  
E-mail: lgct@uel.br, imartins@uel.br

The German Spitz breed has currently shown great interest among those looking for companion dogs. Therefore, it is important that research is conducted in order to establish complementary andrological exams, to choose the best breeder. B-mode ultrasound is extremely important in the clinical evaluation of the reproductive system, just as the Doppler mode has proven to be a notable tool in the evaluation of testicular hemodynamics in dogs. The objective of this study was to correlate Doppler velocimetry of the testicular artery of German Spitz dogs with the characteristics of sperm kinetics and morphology. Eighteen breeding dogs of the German Spitz breed, aged between 2 and 8 years and an average weight of 3.2 kg, belonging to a commercial kennel, were evaluated. B-mode testicular ultrasound (US) was performed to evaluate echogenicity, echotexture and presence of mediastinal degeneration. Doppler evaluation was performed in five regions of the testicular artery (proximal, middle and distal suprastesticular, marginal and intratesticular) and the variables peak systolic velocity (PSV, cm/s), end diastolic velocity (EDV, cm/s), resistivity index (RI) and pulsatility index (PI) were measured. The sperm kinetics of the ejaculate (collected by digital manipulation) was analyzed using the CASA system using the setup for dogs (IVOS II, Hamilton Thorne, USA). Sperm morphology and membrane integrity were assessed by eosin/nigrosin. To compare the US variables in B-mode and the kinetic variables, membrane integrity and sperm morphology, the Mann-Whitney non-parametric test was used. To correlate quantitative US Doppler variables of the testicular artery and sperm kinetics, the Pearson correlation test was used, both with a significance level of 5%. The analyzes for each testis were individualized in each US (n = 36 testis); Regarding ejaculate evaluations (kinetics, membrane integrity and sperm morphology), the results were repeated for the left and right testicles. Ejaculates from dogs with hypoechogenic testicles in relation to the mediastinum (26/36) showed greater sperm membrane integrity (98%) than those with isoechogenic testicles (10/36; 95%). When comparing dogs with heterogeneous (4/36) and homogeneous (32/36) testicles with sperm analysis, there was a difference between the variables membrane integrity (95% vs 98%), total motility (55% vs 76%), percentage of fast sperm (39.5% vs 64.5%), slow (38% vs 22%) and static (7% vs 3%). Nine testes (five dogs) showed some degree of mediastinal degeneration and there was no difference in relation to the variables of kinetics, morphology or integrity of the spermatic membrane, although it is possible to notice a trend in the variables progressive motility (37% vs 44%; p = 0.082), VAP (92.8  $\mu$ m/s vs 108.8  $\mu$ m/s; p = 0.076), VSL (70  $\mu$ m/s vs 86.5  $\mu$ m/s; p = 0.065) and SMI (301.5 vs 335.8; p = 0.089). There was a difference in relation to the Doppler velocimetric analysis in the five regions. In the distal suprastesticular, marginal and intratesticular regions a parabolic pattern of low resistivity was observed; In the middle and proximal suprastesticular regions, a semiparabolic pattern of intermediate to high resistivity was observed, with a sharp systolic peak and low diastolic velocity. There were negative correlations between PSV and IR in several regions of the testicular artery, especially in the intratesticular region, with variables such as total motility (PSV: r = -0.64; IR: r = -0.47); percentage of fast sperm (PSV: r = -0.61; RI: r = -0.52); slow (PSV: r = 0.58; RI: r = 0.49); and straightness (PSV: r = 0.49; RI: r = 0.5). Analysis of testicular echotexture revealed that testes with heterogeneous echotexture are associated with worse sperm quality, suggesting a link between the uniformity of testicular tissue and sperm production, as well as the presence of pathological processes such as testicular degeneration, which affect echotexture and, consequently, the reproductive function. Although animals that had isoechogenic testicles in relation to the mediastinum had worse sperm membrane integrity, there were no animals with hyperechogenic testicles, characteristic of infertile dogs. In the present study, it was clear that there was a tendency towards a reduction in sperm movement in dogs with degenerated mediastinum. The negative correlations between motility and Doppler velocimetric variables highlighted the need to reduce blood velocity when entering the testicle, especially due to the low vascular resistance in the organ's parenchyma. However, this balance must follow an important homeostasis, otherwise, very low speeds can also be harmful, as negative correlations have been identified between VPS and IR in the intratesticular region and total motility and the percentage of fast spermatozoa. It is believed that this is the most sensitive region for evaluating testicular blood flow, as it is responsible for irrigating the parenchyma. It is concluded that Doppler velocimetric values of the testicular artery are correlated with sperm kinetics, therefore, B-mode and Doppler ultrasound are important exams in the selection of German Spitz breeders.

**Keywords:** Pulsed Doppler, breeders, canine, andrological examination, B-mode ultrasound

## **A influência da sazonalidade na morfologia de espermatozoides epididimários de felinos domésticos mantidos em clima subtropical de baixa latitude**

**Vinicius Wagner Silva<sup>1</sup>; Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>; Leticia Amanda dos Santos Silva<sup>1</sup>; Júlia Rodrigues Greghi<sup>1</sup>; Natalia Ribeiro Sambatti<sup>1</sup>; Bruno Alcântara Buzato<sup>1</sup>; Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>; Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida (LARAA) – Departamento de Clínicas Veterinárias -Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná – Brasil

\*e-mail: imartins@uel.br

O felino doméstico é uma espécie que responde ao fotoperíodo, sendo que o aumento da duração de luminosidade favorece sua reprodução. Estudos prévios relatam a influência da sazonalidade na qualidade dos espermatozoides em regiões de clima subtropical em altas latitudes, entretanto é pouco descrita em regiões de baixas latitudes. A qualidade espermática está ligada diretamente com a eficiência reprodutiva e na aplicabilidade das biotecnologias da reprodução e o conhecimento sobre a influência da sazonalidade vem auxiliar na escolha de um momento mais apropriado para manipulação espermática. Este estudo objetivou avaliar a morfologia dos espermatozoides epididimários de felinos domésticos mantidos em clima subtropical de baixa latitude (23°S). Quarenta (n = 40) gatos sem raça definida com idade entre 1 e 3 anos de idade foram divididos em quatro grupos: verão (n = 7); outono (n = 7); inverno (n = 15) e primavera (n = 11). As colheitas foram conduzidas 60 dias após os respectivos solstícios e equinócios. Os animais foram orquiectomizados e os espermatozoides foram recuperados pela técnica de compressão da cauda do epidídimo e ducto deferente em meio diluente TRIS-gema (TRIS, ácido cítrico, 20% gema de ovo, Equex e amicacina) pré-aquecido. Foi realizado esfregaço em lâmina de vidro com 3µL da amostra recuperada mais 3µL do corante eosina-negrosina (BotuVital - Botupharma®, Brasil) e avaliadas sob microscopia ótica de luz (Olympus® CX31, Japão) em 1000x de magnificação. Foram avaliadas 200 células e os defeitos espermáticos foram divididos em defeitos maiores e menores e expressos em porcentagem. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis (P<0,05) e na presença de diferença significativa entre os grupos foi empregado o método de Dunn's para a comparação múltipla entre os pares. A maior porcentagem de defeitos espermáticos foi identificada no inverno (24,41 ± 4,79%) vs. primavera (22,02 ± 14,53%), outono (9,89 ± 6,45%) e verão (7,57 ± 3,37%), refletindo na maior porcentagem de defeitos espermáticos maiores (17,86 ± 4,50%) e menores (6,55 ± 3,14%) no inverno. Os resultados demonstraram que gatos criados na região subtropical de baixa latitude sofrem a influência da sazonalidade, pois apresentaram maior porcentagem de anormalidades morfológicas espermáticas no inverno e primavera. Portanto, a colheita e preservação dos espermatozoides devem ser realizadas preferencialmente no outono ou verão.

**Palavras-chave:** Reprodução, gatos, fotoperíodo, defeitos espermáticos.

## The influence of seasonality on epididymal sperm morphology of domestic cats maintained in a low latitude subtropical climate

Vinicius Wagner Silva<sup>1</sup>; Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>; Leticia Amanda dos Santos Silva<sup>1</sup>; Júlia Rodrigues Greggi<sup>1</sup>; Natalia Ribeiro Sambatti<sup>1</sup>; Bruno Alcântara Buzato<sup>1</sup>; Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>; Maria Isabel Mello Martins<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Andrology and Assisted Animal Reproduction (LARAA) – Veterinary Clinics Department - State University of Londrina (UEL), Paraná - Brazil  
\*e-mail: imartins@uel.br

The domestic cat is a species that responds to the photoperiod, being that the increase of light duration favors their reproduction. Previous studies report the season's influence on sperm quality in subtropical climate zones with high latitudes, however, this influence is poorly described in subtropical zones with low latitudes. Sperm quality is directly linked to reproductive efficiency and in the applicability of reproduction biotechnologies and the knowledge about the seasonality influence helps in choosing a more appropriate moment for sperm manipulation. This study aimed to assess the epididymal sperm morphology of domestic cats maintained in a low latitude subtropical climate (23°S). Forty (n = 40) mixed-breed male cats ranging in age from 1 to 3 years old were divided into four groups: summer (n = 7); autumn (n = 7); winter (n = 15); and spring (n = 11). The collection was conducted after 60 days of solstices and equinoxes. The animals were orchietomized and the sperm was recovered by the compression of the epididymis tail and ductus deferens technique in a pre-heated TRIS-yolk extender (TRIS, citric acid, 20% egg yolk, Equex glucose, and amikacin). A smear was carried out in a glass slide with 3µL of recovered sample and 3µL of eosin-nigrosin dye (BotuVital - Botupharma®, Brazil) and evaluated under optical microscopy (Olympus® CX31, Japan) with a magnification of 1,000x. 200 cells were assessed, and the sperm defects were divided into major and minor defects and expressed in percentage. The data underwent the Kruskal-Wallis test (P<0,05) and in the presence of a significant difference between the groups Dunn's method was employed for multiple comparisons between the pairs. The higher percentage of sperm defects was identified in the winter (24.41 ± 4.79%) vs. spring (22.02 ± 14.53%), autumn (9.89 ± 6.45%), and summer (7.57 ± 3.37%), reflecting in a higher percentage of sperm major defects (17.86 ± 4.50%) and minor defects (6.55 ± 3.14%) in the winter. The results demonstrated that domestic cats raised in a low latitude of subtropical climate suffer the influence of seasonality, as showed a higher percentage of morphological abnormalities in the winter and spring. Therefore, the collection and sperm preservation must be conducted preferably in the autumn or summer.

**Keywords:** Reproduction, cats, photoperiod, sperm defects.

## Comparação de diluidores comerciais para refrigeração de sêmen de cães

Áttila Adão Albuquerque<sup>1</sup>, Antonio Carlos Dertonio Donato<sup>2</sup>, Silvia Edelweiss Crusco<sup>3,4\*</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup> Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de andrologia Animal – FMVZ-USP

<sup>2</sup>Mirai Centro de Diagnósticos Veterinários

<sup>3</sup>UNIP

<sup>4</sup>ANCLIVEPA – SP

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

**Introdução:** A refrigeração de sêmen de cães para posterior utilização em inseminação artificial é uma realidade. A praticidade unida ao custo relativamente baixo e resultados positivos são os principais fatores para a escolha desta biotecnologia. **Objetivo:** o objetivo deste trabalho foi avaliar a performance de dois diluidores comerciais para refrigeração de amostras de sêmen canino durante o tempo de 144 horas. Animais Foram utilizados 03 machos adultos, hípidos, sendo 2 da raça buldogue inglês (A e C) e um macho da Norwich terrier (B), provenientes de um mesmo canil. **Material e Métodos** Foram utilizadas amostras de sêmen puro dos três cães e também foram realizadas 3 amostras de sêmen heterospérmico na proporção de 500 µl +500 µl, sendo composta do sêmen dos cães A+B, A+C e B+C. Foram utilizados dois diluidores comerciais próprios para refrigeração de sêmen de cães (Botudog® e Caniplus Chill®). Imediatamente após a colheita da fração rica, o sêmen avaliado quanto ao volume seminal, coloração e aspecto e uma amostra foi submetida a mensuração da motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática. A morfologia foi analisada com esfregaço corado com Panótico®. Uma fração de 500 µl cada amostra de sêmen foi adicionada de 1000 µl de cada diluidor. As amostras foram acondicionadas em caixa térmica própria para refrigeração e transporte de sêmen e levadas para o laboratório e mantidas a 5°C para dar prosseguimento ao experimento. Iniciou-se a análise computadorizada do sêmen (CASA) de cada amostra, seguindo nos seguintes momentos de tempo em horas, 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144. O efeito do tempo, dos diluidores e parâmetros seminais foram submetidos a análise de variância com teste LSD de comparação de médias. **Resultados:** As amostras de sêmen se comportaram da mesma maneira nos dois diluidores comerciais utilizados. Após 120 horas, todas as amostras de sêmen exibiram declínio na motilidade total e na motilidade progressiva. As médias da motilidade (MT) em função do tempo com o diluidor Botudog® e Caniplus Chill® foram respectivamente 0h (73 ± 14,75% vs. 59,83 ± 24,73%), 24h (74,16 ± 25,33% vs. 83,66 ± 6,88%), 48h (70,5 ± 14,59% vs. 88,33 ± 5,11), 72h (60,33 ± 16 % vs. 62,83 ± 25,05%), 96h (65,16 ± 8,28% vs. 51 ± 27,15%) 120 (44,66% vs. ± 9,07% 42,16 ± 32,42%) 144h (50,5 ± 16,44% vs. 31,33 ± 19,94%). As médias de motilidade progressiva (MP) em função do tempo respectivamente com o diluidor Botudog® e Caniplus Chill® foram 0h (23,83 ± 12,02% vs. 11,33 ± 15,18%), 24h (25,33 ± 15,50% vs. 32,5 ± 18,08%), 48h (16,5 ± 8,21% vs. 34 ± 14,04%), 72h (10,16 v 8,18% vs. 14,16 ± 14,04%), 96h (8,33 ± 4,71% vs. 5,33 ± 7,31%), 120 (5,16 ± 4,75% vs. 7,5 ± 10,98%) e 144h (5,83 ± 3,65% vs. 0,5 ± 0,83%). Não houve diferença na morfologia espermática entre tempo e diluidores. **Discussão e conclusão:** Frente aos resultados apresentados podemos concluir que existem diluidores comerciais próprios para refrigeração de sêmen de cão que oferecem resultados semelhantes, oferecendo assim, opções de escolha para o procedimento de refrigeração. [1] Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science*. 2012 Nov;135(1-4):97–105. [2] Christensen BW, Meyers S. Canine semen evaluation and processing. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2023 Sep 1;53(5):921–30.

**Palavras-chave:** refrigeração, sêmen, diluidores, heterospérmico

## Comparison of commercial extenders for cooling dog semen

Átila Adão Albuquerque<sup>1</sup>, Antonio Carlos Dertonio Donato<sup>2</sup>, Silvia Edelweiss Crusco<sup>3,4\*</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup> Marcílio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de andrologia Animal – FMVZ-USP

<sup>2</sup>Mirai Centro de Diagnósticos Veterinários

<sup>3</sup>UNIP

<sup>4</sup>ANCLIVEPA – SP

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

**Introduction:** Cooling of canine semen for subsequent use in artificial insemination is a reality. The practicality combined with relatively low cost and positive results are the main factors for choosing this biotechnology. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the performance of two commercial extenders for the refrigeration of canine semen samples over a period of 144 hours. **Animals:** Three healthy adult males were used, two English Bulldogs (males A and C) and one Norwich Terrier male (B), from the same kennel. **Material and Methods:** Fresh semen samples from the three dogs were used, and 3 heterospermic semen samples were also prepared in a ratio of 500 µl + 500 µl, composed of semen from dogs A+B, A+C, and B+C. Two commercial extenders specifically for cooling canine semen (Botudog® and Caniplus Chill®) were used. Immediately after collection of the rich fraction, the semen was evaluated for seminal volume, color, and aspect, and a sample was subjected to measurement of progressive motility, vigor, concentration, and sperm morphology. Morphology was analyzed using Panotic®-stained smears. A 500 µl fraction of each semen sample was added with 1000 µl of each extender. The samples were placed in a thermal box designed for semen refrigeration and transport, then taken to the laboratory and maintained at 5°C to continue the experiment. Computer-assisted semen analysis (CASA) of each sample was initiated at the following time points in hours: 0, 24, 48, 72, 96, 120, and 144. The effects of time, extenders, and seminal parameters were subjected to analysis of variance with LSD test for mean comparison. **Results:** The semen samples behaved similarly in both commercial extenders used. After 120 hours, all semen samples showed a decline in total motility and progressive motility. The motility averages (MT) over time with Botudog® and Caniplus Chill® diluents were respectively 0h (73 ± 14,75% vs. 59,83 ± 24,73%), 24h (74,16 ± 25,33% vs. 83,66 ± 6,88%), 48h (70,5 ± 14,59% vs. 88,33 ± 5,11), 72h (60,33 ± 16 % vs. 62,83 ± 25,05%), 96h (65,16 ± 8,28% vs. 51 ± 27,15%) 120 (44,66% vs. ± 9,07% 42,16 ± 32,42%) 144h (50,5 ± 16,44% vs. 31,33 ± 19,94%). The progressive motility averages (MP) over time with Botudog® and Caniplus Chill® diluents were respectively 0h (23,83 ± 12,02% vs. 11,33 ± 15,18%), 24h (25,33 ± 15,50% vs. 32,5 ± 18,08%), 48h (16,5 ± 8,21% vs. 34 ± 14,04%), 72h (10,16 v 8,18% vs. 14,16 ± 14,04%), 96h (8,33 ± 4,71% vs. 5,33 ± 7,31%), 120 (5,16 ± 4,75% vs. 7,5 ± 10,98%) e 144h (5,83 ± 3,65% vs. 0,5 ± 0,83%). There was no difference in sperm morphology between time and extenders. **Discussion and Conclusion:** Based on the presented results, we can conclude that there are commercial extenders suitable for canine semen refrigeration that offer similar results, providing choices for the refrigeration procedure. [1] Goericke-Pesch S, Klaus D, Failing K, Wehrend A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. *Animal Reproduction Science*. 2012 Nov;135(1-4):97–105. [2] Christensen BW, Meyers S. Canine semen evaluation and processing. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2023 Sep 1;53(5):921–30. **Keywords:** refrigeration, semen, extenders, heterospermic.

**Keywords:** cooling, semen, extender, heterospermic

## Implicações sobre a fertilidade de cães da raça Boiadeiro Bernês

Herlon Victor Rodrigues Silva<sup>1\*</sup>, Bruna Farias Brito<sup>2</sup>, Lúcia Daniel Machado da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reprodução de Carnívoros/UECE, Fortaleza, CE, Brasil

<sup>2</sup> Centro Universitário Fametro - UNIFAMETRO, Fortaleza, CE, Brasil

\*E-mail: herlon.silva@uece.br

A criação de cães de raça no Brasil já é bem estabelecida, tendo em vista as necessidades de um mercado pet exigente. Dentre as raças de cães criadas no Brasil, é importante destacar a raça Boiadeiro Bernês, que é uma raça de cães de grande porte, originalmente criada com a finalidade de pastoreio e guarda do gado. No entanto, devido à sua considerável docilidade, vem sendo mais utilizado como cão de companhia. Apesar do Boiadeiro Bernês não figurar entre as 10 raças mais criadas no país, o número de pessoas interessadas em possuir essa raça vem aumentando, entretanto, seu potencial de criação é desacelerado, devido à sua dificuldade de reprodução. Portanto, o objetivo deste trabalho foi descrever os resultados de inseminações de cães da raça Boiadeiro Bernês criados na cidade de Fortaleza/CE e região metropolitana, nos últimos três anos e relacionar com os baixos resultados positivos de gestação. Para tanto, foram acompanhados 20 procedimentos de inseminação artificial intravaginal em cães da raça Boiadeiro Bernês, oriundos de canis particulares situados na cidade de Fortaleza/CE e região metropolitana. Previamente, os cães foram avaliados clinicamente e sendo constatados como saudáveis foram aprovados para a realização do procedimento de inseminação. O acompanhamento reprodutivo das fêmeas foi realizado por meio da citologia vaginal, e quando as cadelas apresentavam percentual de células superficiais acima de 80%, eram realizadas as inseminações. A coleta do sêmen foi realizada por meio de manipulação digital, em que foram avaliados os parâmetros macroscópicos (cor e volume) e microscópicos (motilidade, vigor e concentração). Os resultados foram expressos em média ( $\pm$  desvio padrão). Em relação à cor, 60% das amostras possuíam cor branca opalescente, 10% cor levemente branca e 30% de cor translúcida. Já em relação ao volume do ejaculado, juntando a segunda fração completa e parte da terceira fração, obteve-se a média geral de 7,8 mL ( $\pm$  1,2 mL). Nos parâmetros microscópicos, a média da motilidade foi de 65,3% ( $\pm$  33,7%), do vigor foi de 3,6 ( $\pm$  1,4), e a concentração média foi de  $395,3 \times 10^6$  espermatozoides/mL ( $\pm$   $315 \times 10^6$ ). Após as avaliações, o sêmen era transferido para uma seringa de 20 mL, e acoplado em uma sonda de Osiris (IMV/França), para a injeção do sêmen no fundo da vagina das cadelas. Em seguida, as cadelas eram mantidas por 10 minutos com seu posterior erguido a fim de facilitar o escoamento do sêmen para o interior do útero. Após um mês do último procedimento de cada protocolo de inseminação, foi realizado o diagnóstico gestacional por ultrassonografia, sendo obtido o resultado de apenas 30% de gestação positiva. Ainda dentre as gestações positivas, 33,3% tiveram perdas embrionárias. Já das quatro gestações positivas que seguiram o curso normal, as prolificidades foram (2; 9; 1; 3). Fatores correlacionados ao manejo e ao clima são pontos essenciais que podem interferir no sucesso da reprodução de qualquer espécie, desta forma, é possível supor que a raça Boiadeiro Bernês seja altamente sensível ao tipo de manejo e à temperatura, apresentando implicações para sua fertilidade, tendo em vista que o ideal é ter taxa de sucesso gestacional superiores a 80%. Mais estudos são necessários para compreender qual o principal obstáculo reprodutivo da raça a fim de se buscar uma resolução para este problema e estipular um manejo ou tratamento adequado.

**Palavras-chave:** cães de raça; baixa fertilidade; prenhez canina; inseminação de cães.

## Implications on the fertility of Bernese Mountain Dogs

Herlon Victor Rodrigues Silva<sup>1\*</sup>, Bruna Farias Brito<sup>2</sup>, Lúcia Daniel Machado da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Carnivore Reproduction Laboratory/UECE, Fortaleza, CE, Brazil;

<sup>2</sup> Fametro University Center - UNIFAMETRO, Fortaleza, CE, Brazil.

\*E-mail: herlon.silva@uece.br

Breeding purebred dogs in Brazil is already well established, given the needs of a demanding pet market. Among the dog breeds bred in Brazil, it is important to highlight the Bernese Mountain Dog breed, which is a large breed of dog, originally with the specific purpose of herding and guarding cattle. However due to its specific docility it has been used more as a companion dog. Although the Bernese does not appear among the 10 most bred breeds in the country, the number of people interested in owning this breed is increasing, however, its breeding potential is slowed down due to its difficulty in reproduction. Therefore, the objective of this work was to describe the results of inseminations of Bernese dogs bred in Fortaleza/CE and the metropolitan region, in the last three years and related the low positive pregnancy results. To this, 20 intravaginal artificial insemination procedures were monitored in Bernese Mountain Dogs, from private kennels located in Fortaleza/CE and the metropolitan region. Previously, the dogs were clinically evaluated and their health was confirmed to be approved for the insemination procedure. Reproductive monitoring of females was performed using vaginal cytology, and when the chains showed a percentage of surface cells above 80%, they were performed as inseminations. Semen collection performed through digital manipulation. Macroscopic (color and volume) and microscopic (motility, vigor and concentration) parameters were evaluated, and the results were expressed as mean ( $\pm$  standard deviation). Regarding color, 60% of the samples had an opalescent white color, 10% a slightly white color and 30% a translucent color. Regarding the ejaculate volume, combining the complete second fraction and part of the third fraction, a general average of 7.8 mL ( $\pm$  1.2 mL) was obtained. In microscopic parameters, the average motility was 65.3% ( $\pm$  33.7%), vigor was 3.6 ( $\pm$  1.4), and average concentration was  $395.3 \times 10^6$  sperm/mL ( $\pm$   $315 \times 10^6$ ). After the evaluations, the semen was transferred to a 20 ml syringe, and attached to an Osiris probe (IMV/France), to inject the semen deep into the bitches' vagina. Then, the bitches were kept for 10 minutes with their posterior raised in order to facilitate the flow of semen into the uterus. One month after the last procedure of each insemination protocol, the gestational diagnosis was performed using ultrasound, obtaining the result of only 30% of positive pregnancy. Among the positive pregnancies, 33.3% had embryonic losses. In the four positive pregnancies that followed the normal course, the prolificities were (2; 9; 1; 3). Factors related to management and climate are essential points that can interfere with the successful reproduction of any species. Therefore, it is possible to assume that the Bernese breed is highly sensitive to the type of management and temperature, presenting implications for its fertility, taking into account given that the ideal is to have pregnancy success rates above 80%. More studies are needed to understand the main reproductive obstacle of the breed in order to seek a resolution to this problem and stipulate appropriate management or treatment.

**Keywords:** purebred dogs; low fertility; canine pregnancy; dogs insemination.

## Proteínas plasmáticas seminais podem influenciar a congelabilidade dos espermatozoides em cães?

Laíza Sartori Camargo<sup>1</sup>, Marcos Gomides Carvalho<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Niz Alvarez<sup>2</sup>, Carlos Educando Fonseca-Alves<sup>3,4</sup>, Fabiana Ferreira de Souza<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Biotecnologia (IBTEC), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil; <sup>3</sup>Departamento de Clínica Veterinária, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brasil; <sup>4</sup>Instituto de Ciências da Saúde, UNIP, Bauru, São Paulo, Brasil. \*E-mail fabiana.f.souza@unesp.br

A capacidade dos espermatozoides sobreviverem à criopreservação pode estar relacionada a fatores presentes no plasma seminal que se ligam à membrana espermática, como as proteínas. Assim, este estudo teve como objetivo correlacionar as proteínas plasmáticas seminais e a análise *in vitro* de amostras de espermatozoides caninos congelados e descongelados. Vinte ejaculados de 10 cães foram avaliados frescos e descongelados quanto à cinética espermática, concentração, morfologia espermática, integridade da membrana acrossomal e plasmática, potencial mitocondrial e teste de ligação espermática na membrana perivitelinal da gema de ovo de galinha. Após avaliação, o plasma seminal foi separado por centrifugação e as proteínas foram avaliadas por espectrometria de massa (ESI-QToF MS/MS) utilizando abordagem *shotgun*. As proteínas identificadas foram correlacionadas com os resultados da análise de sêmen usando clusters de fertilidade (cluster 1: médio, cluster 2: alto e cluster 3: baixo) determinados por análise de componentes principais e pontuação VIP. Foi possível identificar proteínas no cluster H relacionadas à fertilidade, principalmente aquelas envolvidas com atividade antioxidante, ligação e atividade catalítica. Concluiu-se que existe influência das proteínas presentes na viabilidade, fertilidade e congelamento dos espermatozoides.

**Palavras-chave:** criorresistência; espermatozoides; canino; proteômica

**Agradecimentos:** Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, número 2015/05353-4)

## Can seminal plasma proteins influence sperm freezability in dogs?

**Laíza Sartori Camargo<sup>1</sup>, Marcos Gomides Carvalho<sup>1</sup>, Marcus Vinícius Niz Alvarez<sup>2</sup>, Carlos Educaro Fonseca-Alves<sup>3,4</sup>, Fabiana Ferreira de Souza<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Institute of Biotechnology (IBTEC), Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Department of Veterinary Clinic, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu, São Paulo, Brazil; <sup>4</sup>Institute of Health Sciences, UNIP, Bauru, São Paulo, Brazil. \*E-mail fabiana.f.souza@unesp.br

The ability of sperm to survive cryopreservation may be related to factors present in the seminal plasma that bind to the sperm membrane, such as proteins. Thus, this study aimed to correlate seminal plasma proteins and in vitro analysis of frozen and thawed canine sperm samples. Twenty ejaculates from 10 dogs were evaluated fresh and thawed for sperm kinetics, concentration, sperm morphology, integrity of the acrosomal and plasma membrane, mitochondrial potential and sperm binding test on the perivitelline membrane of chicken egg yolk. After evaluation, the seminal plasma was separated by centrifugation and the proteins were evaluated by mass spectrometry (ESI-QToF MS/MS) using a shotgun approach. The identified proteins were correlated with semen analysis results using fertility clusters (cluster 1: medium, cluster 2: high and cluster 3: low) determined by principal component analysis and VIP score. It was possible to identify proteins in cluster H related to fertility, especially those involved with antioxidant activity, binding and catalytic activity. It was concluded that there is an influence of the proteins present on the viability, fertility and freezing of sperm.

**Keywords:** cryoresistance; spermatozoa; canine; proteomics

**Acknowledgements:** The authors thank for the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (financing code 001) and São Paulo Research Foundation (FAPESP, number 2015/05353-4)

## Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação.

Nívea de Mattos Góes Vieira<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup>, Atila Adão da Rocha Albuquerque<sup>1</sup>, Marcílio 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

\*e-mail: mnichi@usp.br

O desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecido como estresse oxidativo (EO), pode ser extremamente prejudicial aos espermatozoides dos mamíferos. Essa célula é altamente susceptível ao EO devido ao seu citoplasma reduzido e consequente limitação na reserva antioxidante citoplasmática. Além disso, os espermatozoides exibem em sua membrana uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), facilmente oxidadas e vulneráveis a peroxidação lipídica. Por outro lado, esses ácidos graxos, conferem fluidez a membrana plasmática, desempenhando um importante papel nos processos de fertilização além de proteger os espermatozoides durante a criopreservação. Com base nessas afirmações, adicionar ácidos graxos poli-insaturados na composição do diluente de sêmen canino para a criopreservação seria uma alternativa interessante. No entanto, parece plausível associar a esse diluente com PUFA um tratamento antioxidante para prevenir a exacerbada peroxidação lipídica. Portanto, o objetivo deste estudo foi associar o tratamento antioxidante com suplementação de PUFA, o ácido docosahexaenoico (DHA), ao diluidor para a criopreservação de sêmen canino. Para isso, foram desenvolvidos três experimentos visando a melhora da qualidade do sêmen criopreservado, utilizando-se em cada um deles, o sêmen de oito cães saudáveis e sexualmente maduros e avaliações das amostras para motilidade, membrana plasmática e integridade acrossômica, integridade do DNA, atividade e função mitocondrial e susceptibilidade da peroxidação lipídica. No primeiro estudo avaliou-se a susceptibilidade espermática a diferentes desafios de indução oxidativa (ânion superóxido [O<sub>2</sub><sup>-</sup>], peróxido de hidrogênio [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], radical hidroxil [OH<sup>-</sup>] e malondialdeído [MDA]) na presença ou ausência de plasma seminal (PS). Sêmen com PS teve função mitocondrial preservada contra EROs. No entanto, na ausência de PS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduziu o potencial da membrana mitocondrial. Além do mais, independentemente do PS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi deletério para a cinética espermática e para as membranas plasmática/acrossomal, e OH<sup>-</sup> reduziu a atividade mitocondrial e aumentou a fragmentação do DNA. No entanto, amostras com PS foram mais resistentes para a peroxidação lipídica. O segundo estudo foi feito testando o DHA em três concentrações diferentes, para isso foi dividido em quatro grupos: controle, 1µM DHA, 5µM DHA e 10µM DHA. Desta forma, para o terceiro estudo selecionamos a concentração de 5 µM DHA para associar com os antioxidantes catalase e vitamina E no diluidor. Os antioxidantes foram adicionados ao diluidor de sêmen e divididos em quatro grupos (todos contendo 5µM DHA): controle, vitamina E (0,6mM), catalase (300U/mL) e vitamina E (0,6mM) mais catalase (300U/mL). As amostras foram congelados, descongelados e avaliadas.. As amostras foram testados quanto a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias através do aplicativo *Guided Data Analisis*. A comparação das médias foi realizada por meio do método ANOVA, utilizando o teste LSD (*Least Significant Difference*; comparações múltiplas). Para a descrição dos resultados, significados e seus respectivos erros padrões, foram expressos (média ± erro padrão da média). Em relação a cinética espermática, foi possível observar que o grupo tratado com 5µM e 10µM DHA apresentaram maiores porcentagens de células nas variáveis de espermatozoides com motilidade progressiva e velocidade rápida, com resposta semelhante ao grupo controle; e que o grupo de 1µM DHA demonstrou menores porcentagens de espermatozoides, apresentando diferença significativa comparando ao controle em relação a essas mesmas variáveis. Finalmente, observamos menor porcentagem de espermatozoides estáticos no grupo 5µM DHA em comparação a todos os outros grupos. Desta forma, selecionamos a concentração de 5µM DHA para associar com os antioxidantes vitamina E (0,6mM) e catalase (300U/mL) no segundo experimento, cujos resultados mostraram que o grupo contendo 5µM DHA no diluidor de sêmen canino tratado com vitamina E promoveu efeitos benéficos nas características de cinética espermática, como velocidade média de percurso, velocidade linear, motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides rápidos; enquanto o grupo contendo 5µM DHA no diluidor de sêmen canino tratado com catalase mostrou-se deletéria à mitocôndria espermática, indicando que esse antioxidante parece ter toxicidade para o espermatozoide na concentração utilizada em nosso experimento. Finalmente, diluidor com 5 µM DHA suplementado com vitamina E (0,6Mm) mais catalase (300/mL), não aumentou a qualidade da cinética e estrutura espermáticas, mas melhorou a resistência ao estresse oxidativo e diminuiu a lesã de membrana plasmática. Concluímos que a suplementação do meio diluidor com DHA em associação com a vitamina E melhorou a qualidade espermática pós- descongelamento em sêmen criopreservado de cães.

**Palavras-chave:** Sêmen. Canino. Espécies reativas de oxigênio. Ácido graxo poli-insaturado. Antioxidante.

## Seminal oxidative stress in dogs: a study of spermatozoa susceptibility and possible therapies during sperm cryopreservation

<sup>1</sup> Nívea de Mattos Góes Vieira<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Henrique Thomazo Frias<sup>1</sup>, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai<sup>1</sup>, Thawan Santana Piemonte<sup>1</sup>, Atila Adão da Rocha Albuquerque<sup>1</sup>, Marcílio Nichi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, University of São Paulo

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

\*e-mail: mnichi@usp.br

The imbalance between antioxidant capacity and reactive oxygen species (ROS) production, also known as oxidative stress (OS), can be extremely harmful to mammalian spermatozoa. This cell is highly susceptible to OS due to its reduced cytoplasm and consequent limitation in cytoplasmic antioxidant reserve. Additionally, spermatozoa exhibit a high amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in their membrane, easily oxidized and vulnerable to lipid peroxidation. However, these fatty acids confer fluidity to the plasma membrane, playing an important role in fertilization processes and protecting spermatozoa during cryopreservation. Based on these statements, adding polyunsaturated fatty acids to the composition of canine semen extender for cryopreservation would be an interesting alternative. However, it seems plausible to associate this extender with PUFA with an antioxidant treatment to prevent exacerbated lipid peroxidation. Therefore, the aim of this study was to associate antioxidant treatment with supplementation of PUFA, docosahexaenoic acid (DHA), to the extender for canine semen cryopreservation. For this purpose, three experiments were developed aiming to improve the quality of cryopreserved semen, using semen from eight healthy and sexually mature dogs in each of them and evaluating samples for motility, plasma membrane and acrosome integrity, DNA integrity, mitochondrial activity and function, and susceptibility to lipid peroxidation. In the first study, sperm susceptibility to different oxidative induction challenges (superoxide anion [O<sub>2</sub><sup>-</sup>], hydrogen peroxide [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>], hydroxyl radical [OH<sup>-</sup>], and malondialdehyde [MDA]) was evaluated in the presence or absence of seminal plasma (SP). Semen with SP preserved mitochondrial function against ROS. However, in the absence of SP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced mitochondrial membrane potential. Furthermore, regardless of SP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was detrimental to sperm kinetics and plasma/acrosomal membranes, and OH<sup>-</sup> reduced mitochondrial activity and increased DNA fragmentation. However, samples with SP were more resistant to lipid peroxidation. The second study tested DHA at three different concentrations, divided into four groups: control, 1 μM DHA, 5 μM DHA, and 10 μM DHA. Thus, for the third study, we selected the concentration of 5 μM DHA to associate with the antioxidants catalase and vitamin E in the extender. The antioxidants were added to the semen extender and divided into four groups (all containing 5 μM DHA): control, vitamin E (0.6mM), catalase (300U/mL), and vitamin E (0.6mM) plus catalase (300U/mL). The samples were frozen, thawed, and evaluated. The samples were tested for residual normality (Gaussian distribution) and variance homogeneity using the Guided Data Analysis app. Mean comparisons were performed using ANOVA, applying the LSD test (Least Significant Difference; multiple comparisons). Results, significances, and their respective standard errors were expressed as mean ± standard error of the mean. Regarding sperm kinetics, it was possible to observe that the group treated with 5 μM and 10 μM DHA showed higher percentages of cells in variables of spermatozoa with progressive motility and fast velocity, with a response similar to the control group; and that the 1 μM DHA group showed lower percentages of spermatozoa, presenting significant differences compared to the control regarding these same variables. Finally, we observed a lower percentage of static spermatozoa in the 5 μM DHA group compared to all other groups. Thus, we selected the concentration of 5 μM DHA to associate with the antioxidants vitamin E (0.6mM) and catalase (300U/mL) in the second experiment, whose results showed that the group containing 5 μM DHA in the canine semen extender treated with vitamin E promoted beneficial effects on sperm kinetic characteristics, such as average path velocity, linear velocity, total motility, progressive motility, and fast spermatozoa; while the group containing 5 μM DHA in the canine semen extender treated with catalase proved deleterious to sperm mitochondria, indicating that this antioxidant seems to have toxicity to the spermatozoa at the concentration used in our experiment. Finally, the extender with 5 μM DHA supplemented with vitamin E (0.6mM) plus catalase (300U/mL) did not increase the quality of sperm kinetics and structure but improved resistance to oxidative stress and reduced plasma membrane damage. We concluded that supplementation of the extender medium with DHA in association with vitamin E improved post-thaw sperm quality in cryopreserved semen of dogs.

**Keywords:** Semen. Canine. Reactive oxygen species. Polyunsaturated fatty acid. Antioxidant.

## Mixossarcoma Testicular em Cão: Relato de caso

**Esther Kayla dos Santos Matos<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>2</sup>, Maria Clara Costa Freire do Nascimento<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>2</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>2</sup>, Adamas Tassinari Bonfada<sup>2</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>2</sup>, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>2</sup>, Marcus Vinicius Loiola<sup>2</sup>**

1. Programa de Residência em Reprodução e Obstetrícia Veterinária da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; <sup>2</sup>. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brasil  
\*e-mail: esther\_kayla@hotmail.com

Considerado de rara incidência em cães e gatos, o Mixossarcoma é um tipo de sarcoma de tecidos moles, com origem nas células mesenquimais, que possui como característica a presença de uma porção considerável de matriz mixóide em seu interior. Apresenta-se como uma neoplasia sem conformação definida, de consistência macia, com crescimento lento e infiltrativo, e baixo poder metastático, apesar da sua malignidade. Este trabalho tem como objetivo relatar o diagnóstico de Mixossarcoma em testículo de um cão, Poodle, de dois anos de idade, atendido no setor de Reprodução Animais do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, o qual a tutora relatou uma massa palpável em testículo esquerdo há aproximadamente dois meses. O animal apresentou normalidade no exame físico, entretanto os linfonodos poplíteos estavam reativos, mas sem alterações em outros linfonodos superficiais. Os dois testículos encontravam-se em escroto. O testículo direito apresentava-se em tamanho normal e sem alterações macroscópicas aparentes, já o testículo esquerdo possuía tamanho aumentado, consistência firme-elástica e apresentava uma massa palpável. O animal foi submetido à ablação escrotal com orquiectomia bilateral, sendo o material enviado para estudo histopatológico. Na análise microscópica foram observados fibroblastos imaturos com moderado pleomorfismo, apresentando-se alongados ou estrelados com citoplasma escasso e núcleos pequenos e médios, fusiformes ou ovóides, hipercromáticos e nucléolos pouco evidentes, sustentados por estroma mixomatoso suavemente basofílico abundante, em substituição ao parênquima testicular e epididimário. Foram observados ainda, índice mitótico alto, com média de seis figuras de mitose em objetiva de maior aumento, acompanhadas de diversas células em apoptose, confirmando o diagnóstico de Mixossarcoma. Na análise citopatológica da histopatologia, foi possível observar a relação da origem do tumor com a túnica albugínea e constatou-se que este se infiltrava no parênquima testicular e epididimário, o que corrobora com literatura sobre as características deste tipo de neoplasia que, apesar de um potencial metastático baixo, possui um comportamento agressivo e invasivo localmente. O paciente foi encaminhado para acompanhamento oncológico externo sem retorno. Conclui-se que o tratamento cirúrgico se mostrou como uma eficiente abordagem terapêutica e o exame histopatológico como uma valiosa ferramenta diagnóstica e de prevenção. Dessa forma, compreende-se a importância médica-veterinária deste relato de caso para futuros diagnósticos precoces e tratamento assertivo para o paciente, visto a natureza rara da neoplasia.

**Palavras-chave:** Sarcoma de Tecidos Moles, Histopatológico, Atípico.

## Testicular Myxosarcoma in a Dog: A Case Report

**Esther Kayla dos Santos Matos<sup>1</sup>, Mariana Fernandes Souza<sup>2</sup>, Maria Clara Costa Freire do Nascimento<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>2</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>2</sup>, Adamas Tassinari Bonfada<sup>2</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>2</sup>, Antonio de Lisboa Ribeiro Filho<sup>2</sup>, Marcus Vinicius Loiola<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Residency Program in Veterinary Reproduction and Obstetrics at the School of Veterinary Medicine and Animal Science – Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil; <sup>2</sup>School of Veterinary Medicine and Animal Science – Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil  
\*email:esther\_kayla@hotmail.com

Considered to be rare in dogs and cats, Myxosarcoma is a type of soft tissue sarcoma, originating in mesenchymal cells, which is characterized by the presence of a considerable portion of myxoid matrix inside. It presents as a neoplasm without defined conformation, with a soft consistency and a slow and infiltrative growth, and low metastatic power, despite its malignancy. This work aims to report the diagnosis of Myxosarcoma in testicle a two-year-old dog, Poodle, treated in the Animal Reproduction sector of the University Hospital of Veterinary Medicine of the Federal University of Bahia, in which the owner reported a palpable mass in the left testicle for approximately two months. The animal presented a normal physical examination, however the popliteal lymph nodes were reactive, but there were no changes in the other superficial lymph nodes. The two testicles were in the scrotum. The right testicle was of normal size and without apparent macroscopic changes, while the left testicle was enlarged, firm-elastic in consistency and presented a palpable mass. The animal underwent scrotal ablation with bilateral orchiectomy and the material was sent for histopathological study. In the microscopic analysis, immature fibroblasts with moderate pleomorphism were observed, appearing elongated or stellate with scarce cytoplasm and small and medium nuclei, fusiform or ovoid, hyperchromatic and barely evident nucleoli, supported by abundant gently basophilic myxomatous stroma, replacing the testicular parenchyma and epididymis. A high mitotic index was also observed, with an average of six mitotic figures in a higher magnification lens, accompanied by several cells undergoing apoptosis, confirming the diagnosis of Myxosarcoma. In the cytopathological analysis of the histopathology, it was possible to observe the relationship between the origin of the tumor and the tunica albuginea and it was found that it infiltrated the testicular and epididymal parenchyma, which corroborates the literature on the characteristics of this type of neoplasm which, despite a low metastatic potential, has an aggressive and locally invasive behavior. The patient was referred for external oncological follow-up without return. It is concluded that surgical treatment proved to be an efficient therapeutic approach and histopathological examination as a valuable diagnostic and prevention tool. Therefore, the medical-veterinary importance of this case report is understood for future early diagnoses and assertive treatment for the patient, given the rare nature of the neoplasm.

**Keywords:** Soft Tissue Sarcoma, Histopathological, Atypical.