

## Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos

Henrique Thomazo Frias<sup>1\*</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpcao<sup>3</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>Department of Animal Sciences (IFAS) - University of Florida, Gainesville, USA; <sup>3</sup>Laboratório de Biologia dos Espermatozoides (BioSptz) – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

\*e-mail: henrique.frias@usp.br

O protocolo de congelamento de semen provoca alterações estruturais e metabólicas nos espermatozoides de diversas espécies. Uma das causas dessas alterações são as espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas responsáveis por danos de membrana, DNA e distúrbios mitocondriais nos espermatozoides que, por apresentarem citoplasma reduzido e quantidades limitadas de antioxidantes, são mais susceptíveis às ações desses radicais livres ao longo do processo de criopreservação. Uma alternativa à adição de substâncias antioxidantes no diluidor de sêmen (que combatem as EROs já formadas) seria prevenir a formação dessas EROs, sendo as mitocôndrias espermáticas uma das principais fontes desses radicais que podem ser formados na produção de ATP. O desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons modula a atividade mitocondrial, reduzindo o estresse oxidativo nessas organelas em alguns tipos celulares. De fato, estudos demonstraram os efeitos dessas moléculas desacopladoras no resfriamento e congelamento de sêmen em diversas espécies. Sendo assim, foi proposto a adição do desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP) em crescentes concentrações no meio diluidor de criopreservação. Foram coletados 7 carneiros de raça mestiça condicionados, com vagina artificial. Em seguida, os ejaculados foram diluídos a uma concentração final de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por mL com o diluidor OptiXcell® (IMV Technologies®, Brasil) e separados de acordo com a concentração de DNP e suplementação ou não de glicose. Após a criopreservação, as amostras foram descongeladas e avaliadas para motilidade (CASA), integridade de membrana plasmática e acrossomal (FITC-PSA), status mitocondrial (ensaio DAB e sonda fluorescente JC-1), detecção de EROs (CellRox® green e DCFH), integridade de DNA (SCSA) e susceptibilidade à peroxidação lipídica (TBARS). Foi observada maior porcentagem de espermatozoides com baixa e ausência de atividade mitocondrial (DAB Classe III e IV) nas amostras tratadas com  $10\mu\text{M}$  de DNP em relação ao controle sem adição de glicose ( $P < 0.05$ ), o que poderia indicar um efeito de seleção na presença do desacoplador de células com maior atividade mitocondrial.

**Palavras-chave:** mitocôndria, congelamento de sêmen, carneiro.

## Effect of mitochondrial uncoupling on the ram sperm cryopreservation

Henrique Thomazo Frias<sup>1\*</sup>, João Diego de Agostini Losano<sup>2</sup>, Ken Kawaoka Nagai<sup>1</sup>, Raphaela Gabrielle Brito Sousa<sup>1</sup>, Álvaro de Miranda Alves<sup>1</sup>, Roberta Ferreira Leite<sup>1</sup>, Mayra Elena Ortiz D' Avila Assumpcao<sup>3</sup>, Marcilio Nichi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia – University of São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of Animal Sciences (IFAS) - University of Florida, Gainesville, USA; <sup>3</sup>Laboratório de Biologia dos Espermatozoides (BioSptz) – University of São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil  
\*e-mail: henrique.frias@usp.br

The semen freezing protocol causes structural and metabolic changes in sperm from different species. One of the principal causes of these changes are reactive oxygen species (ROS), molecules responsible for plasma membrane disruption, DNA damage and mitochondrial disorders in sperm, which, due to their reduced cytoplasm and limited amounts of antioxidants, are more susceptible to the actions of these free radicals throughout of the cryopreservation process. An alternative to adding antioxidant substances to the semen extender (which combat already formed ROS) would be to prevent the formation of these ROS, with spermatid mitochondria being one of the main sources of these radicals that can be formed in the production of ATP. Uncoupling of the electron transport chain modulates mitochondrial activity, reducing oxidative stress in these organelles in some cell types. In fact, studies have demonstrated the effects of these uncoupling molecules on cooling and freezing semen in several species. Therefore, it was proposed to add the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) in increasing concentrations to the cryopreservation diluting medium. Seven mixed-breed rams ejaculates were collected utilizing an artificial vagina. Then, the ejaculates were diluted to a final concentration of  $100 \times 10^6$  spermatozoa per mL with the OptiXcell® extender (IMV Technologies®, Brazil) and separated according to the concentration of DNP and glucose supplementation or not. After cryopreservation, samples were thawed and evaluated for motility (CASA), plasma and acrosomal membrane integrity (FITC-PSA), mitochondrial status (DAB assay and JC-1 fluorescent probe), ROS detection (CellRox® green and DCFH), DNA integrity (SCSA) and susceptibility to lipid peroxidation (TBARS). A higher percentage of spermatozoa with low and absent mitochondrial activity (DAB Classes III and IV) was observed in samples treated with 10 $\mu$ M DNP compared to the control without glucose supplementation ( $P < 0.05$ ), which could indicate the selection of higher mitochondrial activity spermatozoa when in presence of the mitochondrial uncoupler.

**Key-words:** semen freezing, ovine, spermatozoa biotechnology, mitochondria.

## Ozônio no resfriamento do sêmen caprino – resultados preliminares

Iara Pierezan Brum<sup>1\*</sup>, Nayara Leontino Scherpinski<sup>1</sup>, Maria Clara Garcia Chweszczuk<sup>1</sup>, Maristela de Cassia Seudo Lopes<sup>2</sup>, Janislene Mach Trentin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina – PR. <sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná (UFPR), Setor Palotina, Palotina – PR  
E-mail: iara.brum@ufpr.br

O ozônio é um gás com propriedades antioxidante, imunestimulante e antimicrobiana. Seu uso tem se popularizado na medicina veterinária nos últimos anos para o tratamento de diversas patologias. Para a preservação do sêmen caprino, a composição do diluente é de suma importância, tendo em vista que certos componentes do plasma seminal possuem efeitos deletérios à viabilidade espermática quando em contato com gema de ovo ou leite. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações de ozônio sobre a qualidade do sêmen caprino durante o resfriamento a 5°C. Adicionalmente buscou-se verificar o efeito do ozônio em diluente a base de leite em pó desnatado ou gema de ovo. Colheitas de sêmen (n = 5) foram realizadas em um bode adulto da raça Boer, com auxílio de vagina artificial e fêmea manequim, com intervalo de uma semana entre elas. Uma amostra de cada ejaculado foi submetida à avaliação de coloração, aspecto, volume, odor, movimento de massa, vigor, motilidade total, concentração e morfologia espermática. O gás ozônio (O<sub>3</sub>) foi obtido através de um gerador portátil programado para liberar um fluxo de ozônio medicinal compatível com os grupos experimentais. Cada ejaculado foi dividido em dez alíquotas e diluído em diluente a base de gema de ovo (TG) ou leite em pó desnatado (LG), sendo: diluente sem ozônio (C) e nas concentrações de 2 µg de O<sub>3</sub>/mL (2OZ), 15 µg de O<sub>3</sub>/mL (15OZ), 30 µg de O<sub>3</sub>/mL (30OZ) e 60 µg de O<sub>3</sub>/mL (60OZ). Para tal, uma seringa foi acoplada ao gerador onde o gás O<sub>3</sub> foi armazenado imediatamente antes de ser incorporado ao sêmen diluído em volumes iguais e homogeneizados por 30s. Cada ejaculado foi diluído até a concentração de 200x10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O efeito do ozônio sobre a viabilidade espermática foi avaliado a fresco (momento 0) através da motilidade total (%), vigor (1-5) e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico (%), HOST) e após 24 e 48 horas de resfriamento em geladeira a 5°C. Já o teste de termorresistência (TTR) foi feito após 24 horas de resfriamento, no qual uma amostra de cada grupo permaneceu durante três horas a 37°C para a análise de motilidade total e vigor. Os resultados obtidos foram analisados através do modelo misto (PROC MIXED, SAS) e o efeito linear testado com contrastes. Não houve diferença entre o grupo controle e os tratamentos (2, 15, 30 e 60OZ) em relação a motilidade (TG: 64±6,52, 62±5,7, 62±9,08, 62±7,58, 55±9,35; LG: 48±25,1, 56±21,04, 55±16,48, 58±16,05, 57±13,04) e vigor (TG: 4, 4, 3,8±0,44, 3,8±0,44, 3,4±0,89; LG: 3±1,22, 3,8±0,44, 3,8±0,44, 3,8±0,44, 3,6±0,54) nas 48h de resfriamento tanto para o diluente TG quanto para o diluente LG, respectivamente (P>0.05). Porém, verificou-se um efeito do diluente após 48h de resfriamento em relação a motilidade (P=0.04), funcionalidade de membrana (HOST) (P=0.0028) e motilidade no TTR (P=0.01) sendo o diluente TG superior ao LG. No teste hiposmótico, a fresco e nas 24h de resfriamento, o grupo controle e tratamentos obtiveram resultados similares (P>0.05), porém nas 48h de resfriamento apenas no diluente TG observou-se um efeito linear (P=0.0023), quanto maior a concentração de ozônio menor a funcionalidade de membrana. No TTR, no diluente LG não houve diferença entre os grupos (P>0.05) em relação a motilidade e vigor. No entanto, no diluente TG observou-se uma tendência (P=0.09) e um efeito linear (P=0.02) no vigor e efeito linear (P=0.04) na motilidade, quanto maior a concentração de ozônio, menor o vigor e a motilidade. Concluímos, baseados nos resultados preliminares, que a adição de ozônio nas concentrações testadas não melhorou a motilidade e vigor do sêmen caprino durante o resfriamento a 5°C. Concentrações altas (30 µg/mL e 60 µg/mL) diminuíram a funcionalidade de membrana, motilidade e vigor após o teste de termorresistência dos espermatozoides caprinos durante o resfriamento em diluente a base de gema de ovo. A composição do diluente influenciou nos parâmetros avaliados e preferencialmente deve-se utilizar o diluente a base de gema de ovo (2,5%) comparado ao leite em pó desnatado para o resfriamento do sêmen caprino.

**Palavras-chaves:** antioxidante, ozonioterapia, diluente, refrigeração espermática

**Agradecimentos:** Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica do primeiro autor. Thainá Minela pela análise estatística.

## Ozone in the cooling of goat semen – preliminary results

Iara Pierezan Brum<sup>1\*</sup>, Nayara Leontino Scherpinski<sup>1</sup>, Maria Clara Garcia Chweszczuk<sup>1</sup>, Maristela de Cassia Seudo Lopes<sup>2</sup>, Janislene Mach Trentin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Reproduction Laboratory, Federal University of Paraná (UFPR), Sector Palotina, Palotina – PR. <sup>2</sup>Federal University of Paraná (UFPR), Sector Palotina, Palotina – PR  
E-mail: iara.brum@ufpr.br

Ozone is an unstable gas with antioxidant, immunostimulant and antimicrobial properties. In recent years, its use has become popular in veterinary medicine to treat several conditions. The composition of the extender is very important for the preservation of goat semen, as certain components of seminal plasma have harmful effects on sperm viability when in contact with egg yolk or milk. Thus, the present work aimed to evaluate the effects of different concentrations of ozone on the quality of goat semen during cooling at 5°C. Additionally, we sought to verify the effect of ozone in combination with an extender that included skimmed milk powder or egg yolk. Semen collections (n = 5) were carried out in an adult Boer buck, with an artificial vagina and female dummy, with a one-week interval between collections. Raw semen was subjected to evaluation of color, appearance, volume, odor, mass movement, vigor, total motility, concentration and sperm morphology. Ozone gas (O<sub>3</sub>) was obtained through a portable generator programmed to release a flow of medicinal ozone compatible with the experimental groups. Each ejaculate was split into ten aliquots and diluted in extender based on egg yolk (TG) or skimmed milk powder (LG), as follows: extender without ozone (C) and ozonized at concentrations of 2 µg of O<sub>3</sub>/mL (2OZ), 15 µg of O<sub>3</sub>/mL (15OZ), 30 µg of O<sub>3</sub>/mL (30OZ) and 60 µg of O<sub>3</sub>/mL (60OZ). Semen treatment was performed with a syringe attached to the generator, where the O<sub>3</sub> gas was stored immediately before being incorporated into an equal volume of diluted semen and homogenized for 30s. Each ejaculate was diluted to a concentration of 200x10<sup>6</sup> cells/mL. Semen was evaluated following ozone treatments at 0 (fresh semen), 24 and 48 hours of cooling at 5°C. At each timepoint, total motility (%), vigor (1-5) and membrane functionality by the hypoosmotic test (%), HOST) were assessed as sperm viability indicators. The thermoresistance test (TTR) was carried out after 24 hours of cooling, in which a sample from each group remained at 37°C for three hours. After the incubation period, analyses of total motility and vigor were carried out. Statistical analyses were performed using a mixed model (PROC MIXED, SAS) and the linear effect was tested with contrasts. There was no difference between the control group and the treatments (2, 15, 30 and 60OZ) in analyses of total motility (extender TG 64±6.52, 62±5.7, 62±9.08, 62±7.58, 55±9.35 and LG extender 48±25.1, 56±21.04, 55±16.48, 58±16.05, 57±13.04) and vigor (TG: 4, 4, 3.8±0.44, 3.8±0.44, 3.4±0.89 and LG extender 3±1.22, 3.8±0.44, 3.8±0.44, 3.8±0.44, 3.6±0.54) in the 48h of cooling for both the TG extender and the LG extender, respectively (P>0.05). However, there was an effect of the extender on motility after 48h of cooling (P=0.04), membrane functionality (HOST) (P=0.0028) and motility in the thermoresistance test (P=0.01), with the TG extender being superior to LG. There was also no difference between the control and the ozone treatments in the hypoosmotic test when the semen was fresh or after 24h of cooling. However, there was a linear effect of ozone treatments on the membrane functionality of semen diluted in the TG extender and cooled for 48h (P=0.0023). Greater ozone concentrations resulted in lower membrane functionality. In the thermoresistance test, motility and vigor were not impacted by ozone treatments when semen was diluted in the LG extender (P>0.05). However, in the TG extender, a trend (P=0.09) and a linear effect (P=0.02) on vigor and a linear effect (P=0.04) on motility were observed in response to ozone treatments. The higher the ozone concentration, the lower the vigor and motility of semen diluted in TG extender. We concluded, based on preliminary results, that the addition of ozone at the concentrations tested did not improve the motility and vigor of goat semen during cooling at 5°C. Higher concentrations (30 µg/mL and 60 µg/mL) decreased membrane functionality, motility and vigor after the thermoresistance test of goat sperm during cooling in egg yolk-based extender. Thus, the composition of the extender influenced the parameters evaluated. Preferably, an extender based on egg yolk (2.5%) should be used instead of skimmed milk-based extenders.

**Keywords:** antioxidants, ozone therapy, extender, refrigerated semen.

**Acknowledgments:** Fundação Araucária for the first author's undergraduate research scholarship. Thainá Minela for the statistical analysis.

## Bloqueios anestésicos reduzem o estresse e elevam a qualidade do sêmen de machos caprinos coletados por eletroejaculação

Leonardo de Almeida Gélío<sup>1</sup>, Mariana Karla Francolino da Silva<sup>2</sup>, Eunice Oba<sup>3</sup>, Douglas Anderson de Freitas<sup>4</sup>, André Maciel Crespillo<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo/SP; <sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP; <sup>3</sup>Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu/SP, Brasil; <sup>4</sup>Comprov Diagnóstico Veterinário®, Valinhos/SP; <sup>5</sup>Central Bela Vista, Botucatu/SP

E-mail: andre.crespillo@centralbelavista.com.br

A eletroejaculação (EE) representa um método de coleta de sêmen empregado tanto em espécies domésticas quanto selvagens. Caracterizada por sua praticidade, a técnica permite a obtenção do sêmen de animais sem que haja a necessidade de prévia excitação, descartando a necessidade do uso de manequins ou fêmeas em estro. Além disso, pode substituir o uso da vagina artificial para animais não treinados ou com baixa libido. No entanto, sua metodologia baseada na estimulação elétrica da inervação envolvida no processo ejacatório pode induzir reações indesejáveis nos animais submetidos a EE, sendo considerada dolorosa e estressante por muitos autores. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação prévia de diferentes bloqueios anestésicos locais, através de dois acessos diferentes, para a redução dos efeitos adversos provocados pela EE em machos caprinos. Para isso, foram utilizados 6 caprinos machos da raça Anglo-Nubiana, hípidos, sem histórico de doenças anteriores, com idade média de 5 anos e pesando entre 30 e 63kg. Todos os animais foram submetidos semanalmente a 5 diferentes tratamentos, sendo **T1** - Controle: coleta de sêmen por EE sem o uso de bloqueios anestésicos; **T2** - Bloqueio da inervação hipogástrica por acesso ventral utilizando 2.5 mg/kg de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro, Brazil); **T3** - Bloqueio por acesso ventral utilizando 2.5 mg/kg de lidocaína 2% e 800mcg/kg de citrato de fentanila (Hipolabor, Minas Gerais, Brazil); **T4** - Bloqueio por acesso perineal utilizando lidocaína e **T5** - Bloqueio por acesso perineal utilizando lidocaína e citrato de fentanila. Os animais foram submetidos às coletas de sêmen 15 minutos após a aplicação dos bloqueios e cada tratamento foi repetido por 3 vezes. O estresse provocado pela EE foi avaliado através da aferição de pressão arterial média, sistólica e diastólica, frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) nos momentos pré e pós-EE. Além disso, foram avaliadas a ocorrência de decúbito e ataxia e o número de vocalizações durante as coletas. Adicionalmente, amostras de sangue foram coletadas para mensuração da concentração sérica de cortisol (radioimunoensaio, Bechman Coulter, Indianapolis, USA) e creatina fosfoquinase (CK; Laborlab® CK NAC, Guarulhos, Brazil). O sêmen obtido através da EE foi avaliado quanto ao volume, cinética e concentração espermática. Os dados gerados foram submetidos à análise de variância (Proc GLM®, SAS, Cary, USA), sendo considerado o efeito isolado dos diferentes tratamentos, o efeito independente do tratamento (animais tratados vs. controle) e o efeito do citrato de fentanila sobre as variáveis estudadas. Foi necessário maior número de estímulos elétricos para resultar na ejaculação quando o bloqueio anestésico foi empregado ( $24,29 \pm 9,73^a$ ) em comparação ao controle ( $T1 = 18,63 \pm 4,32^b$ ;  $P < 0,0001$ ). Da mesma forma, embora os níveis séricos de CK pós-EE não tenham variado entre os diferentes tratamentos ( $P = 0,0785$ ), o uso do bloqueio anestésico (independente do tratamento) resultou em maior concentração de CK ( $P = 0,0501$ ) pós-EE ( $149,40 \pm 83,08^a$ ) quando comparados ao controle ( $112,10 \pm 47,35^b$ ). Os tratamentos que utilizaram apenas lidocaína no bloqueio ventral (**T2** + **T4**) apresentaram maior FR pós-EE ( $39,75 \pm 12,81^a$ ) quando comparados ao controle ( $T1 = 32,37 \pm 4,09^b$ ) ou aos tratamentos que utilizaram fentanila no protocolo anestésico (**T3** + **T5**;  $33,27 \pm 5,09^b$ ;  $P = 0,0119$ ). Menores concentrações séricas de cortisol foram mensuradas para os tratamentos que utilizaram fentanila (**T3** + **T5**;  $19,58 \pm 9,57^b$ ) em comparação aos que utilizaram lidocaína exclusivamente (**T2** + **T4**;  $28,10 \pm 13,04^a$ ) ou ao controle ( $T1$ ;  $25,50 \pm 5,48^a$ ;  $P = 0,0007$ ). Não foram observadas diferenças para motilidade total ( $P = 0,6446$ ), vigor ( $P = 0,7187$ ) e volume dos ejaculados ( $P = 0,0969$ ) quando comparados os diferentes tratamentos. No entanto, maior concentração de espermatozoides foi mensurada para ejaculados obtidos quando a associação de lidocaína e fentanila foi empregada (**T3** + **T5**;  $3923,1 \pm 2234,7^a \times 10^6$  espermatozoides) em comparação ao controle ( $T1$ ;  $2192,3 \pm 1250,6^b \times 10^6$ ) ou a lidocaína de forma isolada (**T2** + **T4**;  $2365,4 \pm 1552,8^b \times 10^6$ ). Conclui-se que a utilização de citrato de fentanila nos bloqueios anestésicos pré-eletroejaculação representa uma alternativa para redução do estresse causado pela EE e para promoção da qualidade dos ejaculados no que diz respeito a concentração espermática. Novos protocolos devem ser estudados para o controle do estresse sem que haja a elevação da quantidade de estímulos elétricos necessários para a ocorrência da ejaculação.

**Palavras-chave:** dor, concentração espermática, estimulação elétrica, fentanil, lidocaína.

## Anesthetic blocks reduce stress and increase the quality of semen from male goats collected by electroejaculation

Leonardo de Almeida Gélío<sup>1</sup>, Mariana Karla Francolino da Silva<sup>2</sup>, Eunice Oba<sup>3</sup>, Douglas Anderson de Freitas<sup>4</sup>, André Maciel Crespilho<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo/SP; <sup>2</sup>Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP; <sup>3</sup>Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu/SP, Brasil; <sup>4</sup>Comprov Diagnóstico Veterinário®, Valinhos/SP; <sup>5</sup>Central Bela Vista, Botucatu/SP.  
E-mail: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

Electroejaculation (EE) is a semen collection method used in both domestic and wild species. The technique allows obtaining semen from animals without the need for prior excitement, eliminating the need for the use of females in estrus. Furthermore, it can replace the use of an artificial vagina for untrained animals or those with low libido. However, its methodology based on electrical stimulation of the innervation involved in the ejaculatory process can induce undesirable reactions in animals undergoing EE, being considered painful and stressful by many authors. The aim of this study was to evaluate the effect of the prior application of different local anesthetic blocks, through two different accesses, for the reduction of adverse effects caused by EE in male goats. For this purpose, 6 healthy male Anglo-Nubian goats, with no history of previous diseases, with an average age of 5 years and weighing between 30 and 63kg, were used. All animals were subjected weekly to 5 different treatments: T1 - Control: semen collection by EE without the use of anesthetic blocks; T2 - Blockage of the hypogastric innervation by ventral access using 2.5 mg/kg of 2% lidocaine (Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro, Brazil); T3 - Blockage by ventral access using 2.5 mg/kg of 2% lidocaine plus 800mcg/kg of fentanyl citrate (Hipolabor, Minas Gerais, Brazil); T4 - Blockage by perineal access using lidocaine; and T5 - Blockage by perineal access using lidocaine and fentanyl citrate. The animals underwent semen collection by EE 15 minutes after the application of the anesthesia, and each treatment was repeated 3 times. The stress induced by EE was assessed by measuring mean, systolic and diastolic blood pressure, heart rate (HR), and respiratory rate (RR) before and after EE. Additionally, the occurrence of recumbency and ataxia, as well as the number of vocalizations during collections, were evaluated. Furthermore, blood samples were collected to measure serum cortisol concentration (radioimmunoassay, Bechman Coulter, Indianapolis, USA) and creatine kinase (CK; Laborlab® CK NAC, Guarulhos, Brazil). The semen obtained through EE was evaluated for volume, kinetics and sperm concentration. The data generated were subjected to analysis of variance (Proc GLM®, SAS, Cary, USA), considering the isolated effect of the different treatments, the effect independent of the treatment (treated animals vs. control), and the effect of fentanyl citrate on the studied variables. A greater number of electrical stimuli were required to result in ejaculation when the anesthetic blockade was employed ( $24.29 \pm 9.73^a$ ) compared to the control ( $T1 = 18.63 \pm 4.32^b$ ;  $P < 0.0001$ ). Similarly, although post-EE serum CK levels did not vary among the different treatments ( $P = 0.0785$ ), the use of anesthetic blockade (regardless of treatment) resulted in higher CK concentration ( $P = 0.0501$ ) post-EE ( $149.40 \pm 83.08^a$ ) compared to the control ( $112.10 \pm 47.35^b$ ). Treatments using only lidocaine in the ventral blockade (T2 + T4) showed higher RR post-EE ( $39.75 \pm 12.81^a$ ) compared to the control ( $T1 = 32.37 \pm 4.09^b$ ) or treatments using fentanyl in the anesthetic protocol (T3 + T5,  $33.27 \pm 5.09^b$ ;  $P = 0.0119$ ). Lower serum cortisol concentrations were measured for treatments using fentanyl (T3 + T5 =  $19.58 \pm 9.57^b$ ) compared to those using lidocaine exclusively (T2 + T4 =  $28.10 \pm 13.04^a$ ) or the control ( $T1 = 25.50 \pm 5.48^a$ ;  $P = 0.0007$ ). No differences were observed for total motility ( $P = 0.6446$ ), vigor ( $P = 0.7187$ ), and ejaculate volume ( $P = 0.0969$ ) when comparing the different treatments. However, a higher sperm concentration was measured in ejaculates obtained when the combination of lidocaine and fentanyl was employed (T3 + T5 =  $3923.1 \pm 2234.7^a \times 10^6$  spermatozoa) compared to the control ( $T1 = 2192.3 \pm 1250.6^b \times 10^6$ ) or lidocaine alone (T2 + T4 =  $2365.4 \pm 1552.8^b \times 10^6$ ). It is concluded that the use of fentanyl citrate in pre-electroejaculation anesthetic blocks represents an alternative for reducing the stress caused by EE and for promoting the quality of ejaculates in terms of sperm concentration. New protocols should be studied for stress control without an increase in the number of electrical stimuli required for ejaculation to occur.

**Keywords:** pain, sperm concentration, electrical stimulation, fentanyl, lidocaine.

## Fertilidade *in vivo* e cinética espermática do sêmen ovino criopreservado com diluentes a base de amidas e glicerol

Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2\*</sup>, Gabriel Felipe Oliveira De Menezes<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup>, Maria Clara Costa Freire do Nascimento<sup>5</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>4</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>3</sup>, Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>6</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>7</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<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>IFBaiano, Senhor do Bomfim, BA; <sup>7</sup>Pós-Graduando em Medicina Veterinária UNESP, Botucatu, SP  
\*e-mail: miguelffb@gmail.com

Com o crescimento projetado da população global até 2050, aliado à crescente demanda no mercado consumidor de alimentos, destaca-se a necessidade de uma maior produtividade na produção de proteína animal. A criopreservação de sêmen, especialmente quando combinada com a inseminação artificial (IA), destaca-se como uma biotecnologia de reprodução animal projetada para enfrentar esse desafio. Nesse contexto, a dimetilacetamida (DMA) e a dimetilformamida (DMF), duas amidas de baixo peso molecular, demonstram um efeito crioprotetor satisfatório. No entanto, ainda há uma lacuna de estudos sobre seu uso específico na criopreservação de sêmen ovino. Assim, objetivou-se explorar o potencial dessas amidas como crioprotetores para o sêmen ovino e seu efeito na taxa de prenhez na IA. Para tanto, após exame andrológico, 25 amostras seminais foram colhidas de 5 carneiros adultos da raça Santa Inês, provenientes da Fazenda Experimental de Entre Rios da UFBA, clinicamente sadios, com idade compreendida entre 18 e 24 meses e com escore de condição corporal de 3. Os ejaculados colhidos, passaram por diluição em meio contendo Tris-gema de ovo acrescido de dois crioprotetores: o glicerol (GL) e a DMA ou DMF, sendo divididos entre os grupos de tratamentos G1: GL6%, G2: GL5%+ DMA1% e G3: GL4%+DMF2% para posterior criopreservação. Para as análises da cinética, utilizou o sistema computadorizado SCA® (New Rout, Miami, USA), no Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária do HOSPMEV-UFBA. Após a avaliação *in vitro* dos parâmetros espermáticos procedeu-se com o teste *in vivo*, através da inseminação artificial em tempo fixo de 107 fêmeas da raça Santa Inês. Em cada grupo foram analisados os seguintes parâmetros espermáticos: Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL), velocidade de percurso (VAP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR), deslocamento de cabeça (ALH), batimento flagelar cruzado (BCF) e Hiperatividade (HYPERACT). Os dados foram processados estatisticamente pelo programa Statistical Package for Social Science (SPSS) versão 21.0 para windows sendo realizado uma análise sobre a média e desvio padrão das variáveis de interesse ao estudo obtidas por meio da análise descritiva. As fêmeas do experimento passaram por uma sincronização de cio com introdução de um implante de progesterona no dia 0 (D0). Oito dias após (D7), foram administrados eCG e cloprostenol sódico, seguindo-se da retirada do implante e administração de hCG, no dia nove (D9). No décimo dia (D10), as fêmeas foram inseminadas por laparoscopia intrauterina e a confirmação da prenhez se deu pela avaliação ultrassonográfica, no dia 40 (D40). As taxas de gestação nos grupos experimentais foram comparadas por meio de estudo de dispersão de frequências utilizando-se o teste qui-quadrado ( $X^2$ ). O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. A análise estatística demonstrou que os tratamentos entre os grupos G1, G2 e G3 não diferiram entre si ( $P>0,05$ ), mantendo uma equivalência em relação a qualidade da cinética espermática, sendo elas, respectivamente, MT (%) -  $51,4 \pm 21,8$ ,  $50,1 \pm 18,7$  e  $47,6 \pm 27,9$ ; MP (%) -  $10,2 \pm 8,6$ ,  $8,1 \pm 5,2$  e  $8,0 \pm 4,6$ ; VCL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) -  $58,3 \pm 15,1$ ,  $57,8 \pm 17,5$  e  $56,9 \pm 14,0$ ; VAP ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) -  $37,9 \pm 16,6$ ,  $36,8 \pm 16,8$  e  $33,4 \pm 9,0$ ; VSL ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) -  $27,3 \pm 17,5$ ,  $36,8 \pm 16,8$  e  $22,7 \pm 8,0$ ; STR (%) -  $67,2 \pm 12,5$ ,  $66,9 \pm 9,7$  e  $66,9 \pm 7,2$ ; LIN (%) -  $43,6 \pm 16,7$ ,  $42,0 \pm 12,6$  e  $39,4 \pm 7,3$ ; ALH ( $\mu\text{m}$ ) -  $3,6 \pm 0,7$ ,  $3,5 \pm 0,5$  e  $3,8 \pm 0,7$ ; BCF (Hz) -  $8,5 \pm 1,7$ ,  $8,8 \pm 1,4$  e  $9,6 \pm 1,7$ ; HYPERACT (%) -  $6,8 \pm 8,5$ ,  $5,4 \pm 5,1$  e  $5,1 \pm 3,4$ . Em relação a avaliação da fertilidade do sêmen congelado, não tiveram diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ ), possuindo taxa de concepção entre G1, G2 e G3, respectivamente, 36,11%, 36,11% e 42,86%. Observou-se que a interação entre o DMA e o DMF com o GL não trouxe nenhum efeito deletério sobre a cinética espermática, independente do crioprotetor utilizado, tal efeito no presente estudo, pode ser devido a sinergia entre os crioprotetores utilizados e também pela curva de resfriamento mais lenta, quando comparada com a outros trabalhos, proporcionando uma melhor interação entre GL/DMA e GL/DMF. Conclui-se que os crioprotetores à base de DMA e DMF na concentração e associação testada demonstraram eficácia na criopreservação do sêmen ovino, além de não comprometerem a taxa de fertilização, indicando seu potencial como alternativas viáveis.

**Palavras-chave:** Criopreservação, espermograma, sêmen.

## ***In vivo* fertility and sperm kinetics of cryopreserved ovine semen with amid-based diluents and glycerol**

**Miguel Ferreira Bomfim Baptista<sup>2\*</sup>, Gabriel Felipe Oliveira De Menezes<sup>2</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>2</sup>, Eduardo de Oliveira Costa<sup>2</sup>, Luiza Figueiredo Barbosa<sup>1</sup>, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes<sup>1</sup>, Maria Clara Costa Freire do Nascimento<sup>5</sup>, Marcos Chalhoub Coelho Lima<sup>4</sup>, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves<sup>3</sup>, Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>6</sup>, Gleice Mendes Xavier<sup>7</sup>, Rodrigo Freitas Bittencourt<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Undergraduate student of Veterinary Medicine at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>2</sup>Graduate student of the Graduate Program in Animal Science in the Tropics at EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>3</sup>Veterinarian at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>4</sup>Professors of Veterinary Medicine at EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>5</sup>Veterinary Reproduction and Obstetrics Residency Program at EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil; <sup>6</sup>IFBaiano, Senhor do Bonfim, BA; <sup>7</sup>Graduate student in Veterinary Medicine at UNESP, Botucatu, SP

\*e-mail: miguelffb@gmail.com

With the projected growth of the global population until 2050, coupled with the increasing demand in the consumer food market, the need for higher productivity in animal protein production is highlighted. Cryopreservation of semen, especially when combined with artificial insemination (AI), stands out as a biotechnology for animal reproduction designed to address this challenge. In this context, dimethylacetamide (DMA) and dimethylformamide (DMF), two low molecular weight amides, demonstrate satisfactory cryoprotective effects. However, there is still a gap in studies regarding their specific use in ovine semen cryopreservation. Thus, the aim was to explore the potential of these amides as cryoprotectants for ovine semen and their effect on pregnancy rate in AI. For this purpose, after andrological examination, 25 semen samples were collected from 5 clinically healthy adult Santa Inês rams, aged between 18 and 24 months, with a body condition score of 3, from the Experimental Farm of Entre Rios, UFBA. The collected ejaculates underwent dilution in medium containing egg yolk Tris supplemented with two cryoprotectants: glycerol (GL) and DMA or DMF, divided into treatment groups G1: GL 6%, G2: GL 5% + DMA 1%, and G3: GL 4% + DMF 2% for subsequent cryopreservation. For sperm kinetic analysis, the SCA® computerized system (New Rout, Miami, USA) was used in the Animal Reproduction and Veterinary Obstetrics Sector of HOSPMEV-UFBA. After *in vitro* evaluation of sperm parameters, an *in vivo* test was conducted through fixed-time artificial insemination of 107 Santa Inês female sheep. The following sperm parameters were analyzed in each group: Total motility (TM), progressive motility (PM), curvilinear velocity (VCL), linear velocity (VSL), average path velocity (VAP), linearity (LIN), straightness (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat-cross frequency (BCF), and hyperactivity (HYPERACT). Data were statistically processed using Statistical Package for Social Science (SPSS) version 21.0 for Windows, with analysis of the mean and standard deviation of the study variables obtained through descriptive analysis. The females in the experiment underwent estrus synchronization by introducing a progesterone implant on day 0 (D0). Eight days later (D7), eCG and sodium cloprostenol were administered, followed by implant removal and hCG administration on the ninth day (D9). On the tenth day (D10), the females were inseminated by intrauterine laparoscopy, and pregnancy confirmation was achieved by ultrasonographic evaluation on day 40 (D40). Pregnancy rates in the experimental groups were compared using frequency dispersion analysis with the chi-square test ( $X^2$ ). The significance level adopted for all analyses was 5%. Statistical analysis showed that the treatments among groups G1, G2, and G3 did not differ significantly ( $P>0.05$ ), maintaining equivalence in terms of sperm kinetic quality, namely: TM (%) -  $51.4 \pm 21.8$ ,  $50.1 \pm 18.7$ , and  $47.6 \pm 27.9$ ; PM (%) -  $10.2 \pm 8.6$ ,  $8.1 \pm 5.2$ , and  $8.0 \pm 4.6$ ; VCL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) -  $58.3 \pm 15.1$ ,  $57.8 \pm 17.5$ , and  $56.9 \pm 14.0$ ; VAP ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) -  $37.9 \pm 16.6$ ,  $36.8 \pm 16.8$ , and  $33.4 \pm 9.0$ ; VSL ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) -  $27.3 \pm 17.5$ ,  $36.8 \pm 16.8$ , and  $22.7 \pm 8.0$ ; STR (%) -  $67.2 \pm 12.5$ ,  $66.9 \pm 9.7$ , and  $66.9 \pm 7.2$ ; LIN (%) -  $43.6 \pm 16.7$ ,  $42.0 \pm 12.6$ , and  $39.4 \pm 7.3$ ; ALH ( $\mu\text{m}$ ) -  $3.6 \pm 0.7$ ,  $3.5 \pm 0.5$ , and  $3.8 \pm 0.7$ ; BCF (Hz) -  $8.5 \pm 1.7$ ,  $8.8 \pm 1.4$ , and  $9.6 \pm 1.7$ ; HYPERACT (%) -  $6.8 \pm 8.5$ ,  $5.4 \pm 5.1$ , and  $5.1 \pm 3.4$ . Regarding the evaluation of frozen semen fertility, there was no significant difference between the groups ( $P>0.05$ ), with conception rates between G1, G2, and G3 being 36.11%, 36.11%, and 42.86%, respectively. It was observed that the interaction between DMA and DMF with GL did not have any deleterious effect on sperm kinetics, regardless of the cryoprotectant used. This effect in the present study may be due to the synergy between the cryoprotectants used and also to the slower cooling curve compared to other works, providing a better interaction between GL/DMA and GL/DMF. It is concluded that cryoprotectants based on DMA and DMF in the tested concentration and combination demonstrated efficacy in ovine semen cryopreservation, without compromising fertilization rate, indicating their potential as viable alternatives.

**Keywords:** Cryopreservation, spermogram, semen.