

Diferenças morfológicas no plexo pampiniforme e no mediastino testicular em touros Nelore e Canchim pré-púberes identificadas por ultrassonografia modo B

Joedson Dantas Gonçalves¹, Maria Emilia Franco Oliveira¹, Rubens Paes de Arruda², Leonardo Machestropa Arikawa¹, Giovanna Galhardo Ramos², Alda Juliana Castro de Sousa³, Gabriela Novais Azevedo⁴, Alessandra Regina Carrer², Vinicius Rosendo Piloto⁴, Alexandre Rossetto Garcia⁵

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil

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

⁴Bolsista de Treinamento Técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

⁵Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

Autor correspondente: Joedson Dantas Gonçalves. E-mail: joedson.goncalves@unesp.br

A utilização da ultrassonografia dos órgãos reprodutivos pode ser uma importante ferramenta auxiliar na avaliação andrológica de touros. Seu uso pode ser considerado na caracterização morfológica de animais de diferentes raças e faixas etárias, para identificação precoce de possíveis anomalias. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar com uso de ultrassonografia Modo B as estruturas testiculares de machos pré-púberes das raças Nelore e Canchim, tendo como foco os vasos do plexo pampiniforme e o mediastino testicular. Foram usados 48 animais, sendo 24 Nelore (*Bos indicus*) e 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), com idade média de 7,7±0,5 meses, 200,5±22,2 kg de peso vivo e escore de condição corporal 5,0 (escala de 1-9). Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado intensivo de *Urochloa brizantha* (cv Piatã) com acesso *ad libitum* a mistura mineral e água. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas em uma vez ao mês, durante 6 meses, com equipamento Z60 Vet® (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co, China), com uso de transdutor linear multifrequencial de 5,0-8,0 MHz (52 mm; modelo 6LE5VP). As avaliações foram realizadas com os animais contidos em brete, sem uso de sedação prévia, com o equipamento ajustado em modo B, em frequência de 7,5 MHz. Para avaliação do mediastino, foram realizadas varreduras bilaterais do parênquima testicular, em plano sagital, com o transdutor posicionado no terço médio do órgão. Para a avaliação bilateral dos vasos do plexo pampiniforme, o transdutor foi posicionado sobre o funículo espermático. As imagens foram capturadas e posteriormente avaliadas em laboratório. A avaliação do mediastino foi realizada em *frame* selecionado, sendo considerada como variável de interesse a largura do mediastino (Wmed, mm), mensurada por linha traçada perpendicularmente à estrutura. A avaliação da largura dos vasos do plexo pampiniforme (Wplexus, mm) foi realizada em três *frames* selecionados, sendo as mensurações obtidas da largura de três porções da estrutura. As mensurações foram realizadas com o software ImageJ® (National 14 Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Para todas as análises, foram extraídas as médias das três mensurações realizadas. Foram feitas comparações entre raça (Nelore x Canchim), idade (7, 8, 9, 10, 11 e 12 meses) e suas possíveis interações. Os dados foram submetidos à avaliação de normalidade (Shapiro Wilk) e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA). Foi aplicado o modelo linear misto ajustado aos dados de medidas repetidas no tempo. As análises foram feitas com uso do software R, tendo sido adotado o nível de significância de 5% (P < 0,05). Houve diferença entre as raças para Wplexus (P = 0,005), com valores superiores para a raça Canchim (1,20 ± 0,25^a mm) em relação à raça Nelore (1,06 ± 0,27^b mm). Houve efeito significativo da idade sobre Wplexus: 7 (0,73 ± 0,16^a mm), 8 (0,98 ± 0,15^b mm), 9 (1,10 ± 0,15^c mm), 10 (1,23^d ± 0,16 mm), 11 (1,34^e ± 0,16 mm) e 12 meses (1,36^e ± 0,20 mm), com crescimento progressivo, independente da raça (P = 0,001). Não houve interação entre raça e idade para Wplexus (P = 0,85). Animais Canchim apresentaram valores superiores para Wmed (2,78 ± 0,71^a mm) em relação a animais Nelore (2,35 ± 0,53^b mm) (P = 0,0004). Houve diferença significativa entre as idades avaliadas: 7 (1,92 ± 0,41^a mm), 8 (2,20 ± 0,51^b mm), 9 (2,43 ± 0,51^c mm), 10 (2,74 ± 0,56^d mm), 11 (2,95 ± 0,54^e mm) e 12 meses (3,10 ± 0,56^f mm), com crescimento progressivo da Wmed com o avançar a idade, independente da raça (P < 0,001). Não houve interações entre raça e idade para a Wmed (P = 0,35). Em conclusão, machos pré-púberes Canchim possuem vasos do plexo pampiniforme e mediastino testicular mais calibrosos do que os contemporâneos da raça Nelore. Além disso, os vasos do plexo pampiniforme e do mediastino apresentam um expressivo e progressivo aumento dimensional entre os 7 e 12 meses de idade (FAPESP, Processo 2021/04335-3).

Palavras-chave: Ultrassonografia; Andrologia Animal; Morfologia Testicular; Bovinos.

Morphological differences in the pampiniform plexus and testicular mediastinum in prepubertal Nelore and Canchim bulls identified by B-mode ultrasound

Joedson Dantas Gonçalves¹, Maria Emilia Franco Oliveira¹, Rubens Paes de Arruda², Leonardo Macheostropa Arikawa¹, Giovanna Galhardo Ramos², Alda Juliana Castro de Sousa³, Gabriela Novais Azevedo⁴, Alessandra Regina Carrer², Vinicius Rosendo Piloto⁴, Alexandre Rossetto Garcia⁵

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil

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

⁴Bolsista de Treinamento Técnico da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

⁵Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil
 E-mail: joedson.goncalves@unesp.br

Using ultrasound of reproductive organs can be an essential auxiliary tool in the andrological evaluation of bulls. Its use can be considered in the morphological characterization of animals of different breeds and age groups for early identification of possible anomalies. Thus, this study aimed to evaluate the testicular structures of pre-pubertal males of the Nelore and Canchim breeds using B-Mode ultrasound, focusing on the vessels of the pampiniform plexus and the testicular mediastinum. Forty-eight animals were used, 24 Nelore (*Bos indicus*) and 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), with an average age of 7.7±0.5 months, 200.5±22.2 kg live weight and body condition score 5.0 (scale 1-9). The animals were maintained in an intensive rotational grazing system of *Urochloa brizantha* (cv Piatã) with *ad libitum* access to a mineral mixture and water. Ultrasound evaluations were performed once a month for six months with Z60 Vet® equipment (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co, China), using a 5.0-8.0 MHz multifrequency linear transducer (52 mm; model 6LE5VP). The evaluations were carried out with the animals in a chute, without prior sedation, with the equipment set to B-mode at a frequency of 7.5 MHz. Bilateral scans of the testicular parenchyma were performed to evaluate the mediastinum in the sagittal plane, with the transducer positioned in the middle third of the organ. The transducer was placed over the spermatic cord for bilateral assessment of the pampiniform plexus vessels. The images were captured and later evaluated in the laboratory. The mediastinum was assessed in a selected *frame*, with the width of the mediastinum (Wmed, mm) being considered as the variable of interest, measured by a line drawn perpendicular to the structure. The width of the vessels of the pampiniform plexus (Wplexus, mm) was assessed in three selected *frames*, with measurements obtained from the width of three portions of the structure. Measurements were performed using ImageJ® software (National 14 Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The means of the three measurements carried out were extracted for all analyses. Comparisons were made between breeds (Nelore x Canchim), ages (7, 8, 9, 10, 11, and 12 months), and their possible interactions. The data were subjected to normality assessment (Shapiro Wilk) and subsequently to analysis of variance (ANOVA). The linear mixed model was applied to data from repeated measurements over time. The analyses were conducted using the R software, adopting a significance level of 5% ($P < 0.05$). There was a difference between the breeds for Wplexus ($P = 0.005$), with higher values for the Canchim breed (1.20 ± 0.25^a mm) compared to the Nelore breed (1.06 ± 0.27^b mm). There was a significant effect of age on Wplexus: 7 (0.73 ± 0.16^a mm), 8 (0.98 ± 0.15^b mm), 9 (1.10 ± 0.15^c mm), 10 ($1.23^d \pm 0.16$ mm), 11 ($1.34^e \pm 0.16$ mm) and 12 months ($1.36^e \pm 0.20$ mm), with progressive growth, regardless of breed ($P = 0.001$). There was no interaction between race and age for Wplexus ($P = 0.85$). Canchim animals presented higher values for Wmed (2.78 ± 0.71^a mm) compared to Nelore animals (2.35 ± 0.53^b mm) ($P = 0.0004$). There was a significant difference between the ages evaluated: 7 (1.92 ± 0.41^a mm), 8 (2.20 ± 0.51^b mm), 9 (2.43 ± 0.51^c mm), 10 (2.74 ± 0.56^d mm), 11 (2.95 ± 0.54^e mm) and 12 months (3.10 ± 0.56^f mm), with progressive growth of Wmed with advancing age, regardless of breed ($P < 0.001$). There were no interactions between breed and age for Wmed ($P = 0.35$). In conclusion, Canchim pre-pubertal males have more prominent pampiniform plexus vessels and testicular mediastinum than their contemporaries of the Nelore breed. Furthermore, the vessels of the pampiniform plexus and the mediastinum show a significant and progressive increase in size between 7 and 12 months of age (FAPESP, Process 2021/04335-3).

Keywords: Ultrasonography; Animal Andrology; Testicular Morphology; Cattle.

Impacto do glicerol na preservação da viabilidade do sêmen de búfalos durante a refrigeração

Almeida, J.^{1*}, Brito, M. F.², Neves, B. P.², Becerra, V.A.B.², Auler, P.A.²;
Henry, M² (In memoriam), Resende, O.A.³ (In memoriam)

¹Universidade Santa Úrsula - USU, Botafogo, RJ, Brasil; ²Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; ³Embrapa Agrobiologia/Seropédica, Seropédica, RJ, Brasil
*E-mail: jaciveterinario@usul.br

É amplamente reconhecido que a redução mais acentuada na qualidade seminal se manifesta com a extensão do tempo de incubação, independentemente das características do extensor empregado, da taxa de diluição e da temperatura de armazenamento. Os efeitos primordiais identificados compreendem a diminuição da motilidade espermática progressiva (MP) e a deterioração da integridade da membrana (HOST). Esses fenômenos são possivelmente desencadeados pelo acúmulo de produtos metabólicos, com destaque para as espécies reativas de oxigênio (ROS), cuja presença compromete tanto o transporte quanto a viabilidade dos espermatozoides no trato genital feminino. No processo de congelamento do sêmen, emprega-se o glicerol, que desempenha um papel crucial na estabilização da membrana espermática. Essa estabilização ocorre devido à interação do glicerol com o espermatozoide, resultando na sua metabolização e conversão em uma fonte adicional de energia, que é posteriormente utilizada durante o processo de fertilização. Caso essa observação seja corroborada, a inclusão de glicerol nos extensores empregados para a conservação do sêmen bubalino refrigerado poderia potencialmente otimizar as taxas de fertilidade do sêmen armazenado. Com o intuito de responder a essa questão, conduziu-se um estudo comparativo da viabilidade do sêmen bubalino refrigerado e diluído em TRIS com 10% de LDL (lipoproteína de baixa densidade, substituindo a gema de ovo), avaliando a preservação da longevidade espermática ao longo do processo utilizando ou não o glicerol a 7%. Com este propósito, foram empregadas amostras seminais provenientes de seis touros da raça Murrah, com idades variando entre 48 e 60 meses, mantidas a uma temperatura de 5°C por um período de 72 horas, utilizando-se um sistema passivo de refrigeração (balcão frigorífico). A avaliação da motilidade espermática imediatamente após a diluição final foi conduzida de maneira subjetiva, empregando um microscópio de contraste de fase Nikon 200 (T0 horas). Para as avaliações subsequentes (T1, T24, T48 e T72 horas após a diluição com refrigeração a 5°C), uma alíquota depositada em tubo Eppendorf[®] de 1,5 mL foi incubada em um banho seco a 37°C por 5 minutos, antes de ser submetida à análise da motilidade pelo sistema computadorizado CASA (modelo Sperm Class Analyzer - SCA[®] v.4.0). Os parâmetros utilizados no setup para a análise do sêmen de búfalos foram os seguintes: área da partícula (20 a 70 microns²), VCL (10 < Slow < 25 e Medium < 50), Progressividade (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Pontos para o VAP (5) e Conectividade (12). Para a análise pelo sistema CASA, foram aplicadas gotas de 5 µL de cada amostra entre lâmina e laminula, previamente mantidas a 37°C. Cada amostra foi analisada em 5 campos capturados de forma homogênea, com um mínimo de 200 células espermáticas em cada um deles. O delineamento amostral foi concebido empregando dois extensores, realizando quatro avaliações em diferentes momentos e utilizando seis reprodutores, estabelecendo assim um esquema de blocos que caracteriza três fontes de variação (extensor, tempo de refrigeração e reprodutor). Devido à natureza deste delineamento, que envolve blocos aleatórios com medidas repetidas em cada tratamento e animal, o teste de Friedman foi aplicado. Este teste foi conduzido comparando todas as combinações possíveis de pares de tratamentos (comparação pairwise). O software estatístico empregado para análise foi o STATA 12.0 Statistical Analysis Software (Statacorp, 2012). Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Friedman (p<0,05). Foram registrados os seguintes valores médios para os extensores com e sem glicerol, nos diferentes períodos de tempo pós-diluição e refrigeração, para a motilidade progressiva (83,5^a e 80,5%); (78,3^a e 72,7^{a0}); (57,5^a e 54,0^{a0}); (46,4^a e 44,0^{a0}); e para a integridade da membrana (HOST) (81,5^a e 80,3^{a0}); (74,9^a e 73,7^{a0}); (67,9^a e 66,6^{a0}); (60,9^a e 59,4^{a0}), respectivamente. Os resultados obtidos revelaram a ausência de diferenças estatisticamente significativas (P>0,05) entre o uso de extensores com ou sem glicerol para o processo de refrigeração do sêmen bubalino, conforme as condições experimentais. Resultados similares foram observados para a integridade da membrana espermática avaliada pelo teste HOST. Com base nessas constatações, é possível inferir que o extensor TRIS contendo 10% de LDL sem glicerol demonstrou ser eficaz *in vitro* na preservação da qualidade do sêmen (motilidade individual, viabilidade e integridade da membrana espermática) durante a refrigeração a 5 °C por até 72 horas. Adicionalmente, considerando aspectos de praticidade e economia na preparação do extensor sem glicerol, recomenda-se sua utilização em programas de inseminação artificial (IA) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de búfalos por até 48 horas, com vistas a melhorar as taxas de concepção.

Palavras chave: Análise Computadorizada do Sêmen, longevidade espermática, teste hiposmótico.

Impact of glycerol on preserving the viability of buffalo semen during refrigeration

Almeida, J.^{1*}, Brito, M. F.², Neves, B. P.², Becerra, V.A.B.², Auler, P.A.²,
Henry, M² (*In memoriam*), Resende, O.A.³ (*In memoriam*)

¹University Santa Úrsula, Botafogo, RJ, Brazil; ²Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ³Embrapa Agrobiologia/Seropédica, Seropédica, RJ, Brazil
*Email: jaciveterinarioj@gmail.com

It is widely recognized that the most pronounced reduction in seminal quality occurs with the extension of the incubation time, regardless of the characteristics of the extender used, the dilution rate and the storage temperature. The primary effects identified include decreased progressive sperm motility (PM) and deterioration of membrane integrity (HOST). These phenomena are possibly triggered by the accumulation of metabolic products, especially reactive oxygen species (ROS), whose presence compromises both the transport and viability of sperm in the female genital tract. In the semen freezing process, glycerol is used, which plays a crucial role in stabilizing the sperm membrane. This stabilization occurs due to the interaction of glycerol with sperm, resulting in its metabolization and conversion into an additional source of energy, which is subsequently used during the fertilization process. If this observation is corroborated, the inclusion of glycerol in the extenders used to preserve refrigerated buffalo semen could potentially optimize the fertility rates of stored semen. In order to answer this question, a comparative study was conducted on the viability of refrigerated buffalo semen diluted in TRIS with 10% LDL (low-density lipoprotein, replacing egg yolk), evaluating the preservation of sperm longevity at throughout the process using or not using 7% glycerol. For this purpose, seminal samples were used from six Murrah bulls, aged between 48 and 60 months, kept at a temperature of 5 °C for a period of 72 hours, using a passive refrigeration system (counter fridge). The evaluation of sperm motility immediately after the final dilution was conducted subjectively, using a Nikon 200 phase contrast microscope (T0 hours). For subsequent evaluations (T1, T24, T48 and T72 hours after dilution with refrigeration at 5 °C), an aliquot deposited in a 1.5 mL Eppendorf® tube was incubated in a dry bath at 37 °C for 5 minutes, before being subjected to motility analysis using the CASA computerized system (Sperm Class Analyzer model - SCA® v.4.0). The parameters used in the setup for analyzing buffalo semen were the following: particle area (20 to 70 microns²), VCL (10 < Slow < 25 and Medium < 50), Progressivity (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Points for VAP (5) and Connectivity (12). For analysis using the CASA system, 5 µL drops of each sample were applied between the slide and coverslip, previously kept at 37 °C. Each sample was analyzed in 5 homogeneously captured fields, with a minimum of 200 sperm cells in each of them. The sampling design was designed using two extenders, carrying out four evaluations at different times and using six reproducers, thus establishing a block scheme that characterizes three sources of variation (extender, refrigeration time and reproducer). Due to the nature of this design, which involves randomized blocks with repeated measurements in each treatment and animal, the Friedman test was applied. This test was conducted by comparing all possible combinations of treatment pairs (pairwise comparison). The statistical software used for analysis was STATA 12.0 Statistical Analysis Software (Statacorp, 2012). The results obtained were subjected to the Friedman test ($p < 0.05$). The following average values were recorded for the extenders with and without glycerol, in the different post-dilution and refrigeration time periods, for progressive motility (83.5^a and 80.5^{a%}); (78.3^a and 72.7^{a%}); (57.5^a and 54.0^{a%}); (46.4^a and 44.0^{a%}); and for membrane integrity (HOST) (81.5^a and 80.3^{a%}); (74.9^a and 73.7^{a%}); (67.9^a and 66.6^{a%}); (60.9^a and 59.4^{a%}), respectively. The results obtained revealed the absence of statistically significant differences ($P > 0.05$) between the use of extenders with or without glycerol for the buffalo semen refrigeration process, depending on the experimental conditions. Similar results were observed for sperm membrane integrity assessed by the HOST test. Based on these findings, it is possible to infer that the TRIS extender containing 10% LDL without glycerol demonstrated to be effective *in vitro* in preserving semen quality (individual motility, viability and integrity of the sperm membrane) during refrigeration at 5 °C for up to 72 hours. Additionally, considering aspects of practicality and economy in the preparation of the glycerol-free extender, it is recommended to use it in artificial insemination (AI) and fixed-time artificial insemination (FTAI) programs of buffaloes for up to 48 hours, with a view to improving rates of conception.

Keywords: Computerized Semen Analysis, sperm longevity, hyposmotic test.

Influência da contaminação bacteriana no sêmen criopreservado de touros sob as características espermáticas

Lilian Scalon Zancheta¹, Rubens Paes de Arruda², Adolfo Firmo Ferreira³, Ricardo Araújo Micai³, Ana Clara Faquineli Cavalcante³, Lara Pieshko¹, Renata Lançoni^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

³Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

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

O uso do sêmen bovino criopreservado para inseminações artificiais é uma prática amplamente difundida na reprodução desta espécie atualmente. Assim, é de extrema importância analisar a qualidade seminal para garantir uma boa taxa de fertilidade. Porém a presença de bactérias no sêmen usado pode levar a perda de integridade de membranas espermáticas e maior produção de espécies reativas de oxigênio, o que pode inviabilizar seu uso para inseminação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar a influência da contaminação bacteriana no sêmen criopreservado de bovinos sob a motilidade pós descongelamento, integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial. Para isso, foram utilizadas 6 (seis) partidas de sêmen, sendo 3 (três) com média de 26,33 unidades formadoras de colônias (UFC) e 3 (três) sem unidades formadoras de colônias (UFC), ambas coletadas do mesmo touro para maior controle de variáveis indesejadas. A motilidade foi avaliada pelo sistema de análise computadorizada da motilidade (CASA) e as integridades de membranas foram avaliadas por meio das sondas Iodeto de Propídio, Hoechst 33342, FITC-PSA e JC-1 sob microscopia de epifluorescência e classificadas quanto às porcentagens de células com todas as membranas íntegras (PIAIA – membrana plasmática íntegra, acrossomo íntegro e alto potencial de membrana mitocondrial), porcentagens de células com membrana plasmática íntegra (MPI), acrossomo íntegro (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (APMM). Os dados foram avaliados comparativamente pelo teste T entre os grupos com UFC e sem UFC considerando $P \leq 0,05$ como diferença significativa, sendo apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos. A motilidade foi de 51,93% ($\pm 3,23$) no grupo com UFC e de 54,63% ($\pm 5,35$) no grupo sem UFC. Já a concentração foi de $9,76 \times 10^9$ de espermatozoides/mL ($\pm 0,91$) no grupo com UFC e de $10,80 \times 10^9$ espermatozoides/mL ($\pm 1,05$) no grupo sem UFC. A porcentagem de células com todas as membranas íntegras foi de 45,00% ($\pm 3,90$) no grupo com UFC e de 38,33% ($\pm 3,19$) no grupo sem UFC. Sendo a porcentagem de células apenas com a membrana plasmática íntegra de 45,00% ($\pm 3,90\%$) no grupo com UFC e de 38,33% ($\pm 3,19$) no grupo sem UFC. Em relação a porcentagem de células com a membrana acrossomal íntegra, no grupo com UFC foi de 77,83% ($\pm 3,63\%$) e no grupo sem UFC foi 76,33% ($\pm 1,20\%$). A porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial foi de 45,33% ($\pm 3,63$) no grupo com UFC e 38,50% ($\pm 3,32$) no grupo sem UFC. Por fim, pode-se concluir que não foram observados efeitos deletérios da contaminação bacteriana no sêmen, nas variáveis observadas dessas partidas analisadas, porém pretende-se realizar teste de fertilidade com essas amostras para observar se existe efeito da contaminação na taxa de prenhez.

Palavras-chave: sêmen; bovino; criopreservado; integridade de membranas; motilidade.

Influence of bacterial contamination on cryopreserved semen of bulls on sperm characteristics

Lilian Scalon Zancheta¹, Rubens Paes de Arruda², Adolfo Firmo Ferreira³, Ricardo Araújo Micai³, Ana Clara Faquineli Cavalcante³, Lara Pieshko¹, Renata Lançoni^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

³Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

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

The use of cryopreserved bovine semen for artificial inseminations is a widespread practice in the reproduction of this species. Thus, is important to analyze the seminal quality to ensure good fertility rates. However, the presence of bacteria in the semen can lead to integrity loss of sperm membranes and increased production of reactive oxygen species, which can make unviable its use for insemination. Therefore, the objective of this study was to analyze the influence of bacterial contamination on the post-thaw motility, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential of cryopreserved semen of cattle. For this, 6 (six) semen batches were used, 3 (three) with 26.33 colony-forming units (CFU) and 3 (three) without colony-forming units (CFU), both collected from the same bull for greater control of undesirable variables. Motility was evaluated by the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and membranes integrity was evaluated using the Propidium Iodide, Hoechst 33342, FITC-PSA and JC-1 probes under epifluorescence microscopy and classified according to the percentage of cells with all membranes intact (IPMIAH - intact plasma membrane, intact acrosome and high mitochondrial membrane potential), the percentage of cells with intact plasma membrane (IPM), intact acrosome (IA) and high mitochondrial membrane potential (HMMP). The data was statistically evaluated by the T-test between the groups with and without CFU, considering $P \leq 0.05$ as a significant difference, being presented as mean standard error (MSE). No significant statistical differences were found between the groups. Motility was 51,93% ($\pm 3,23$) in the CFU group and 54,63% ($\pm 5,35$) in the non-CFU group. The concentration was $9,76 \times 10^9$ sperm/mL ($\pm 0,91$) in the CFU group and $10,80 \times 10^9$ sperm/mL ($\pm 1,05$) in the group without CFU. The percentage of cells with all membranes intact was 45,00% ($\pm 3,90$) in the CFU group and 38,33% ($\pm 3,19$) in the non-CFU group. The percentage of cells with only intact plasma membrane was 45,00% ($\pm 3,90\%$) in the group with CFU and 38,33% ($\pm 3,19$) in the group without CFU. Regarding the percentage of cells with intact acrosomal membrane in the group with CFU was 77.83% ($\pm 3.63\%$) and in the group without CFU was 76.33% ($\pm 1.20\%$). The percentage of cells with high mitochondrial membrane potential was 45,33% ($\pm 3,63$) in the CFU group and 38,50% ($\pm 3,32$) in the non-CFU group. Finally, it can be concluded that no deleterious effects of bacterial contamination in semen were observed in the variables observed in the matches analyzed, but we intend to carry out fertility tests with these samples to see if there is an effect of contamination on the pregnancy rate.

Keywords: semen; cattle; cryopreserved; membrane integrity; motility.

Efeito da terapia mitocondrial na qualidade espermática pós-descongelamento em bovinos

Álvaro de Miranda Alves¹, Roberta Ferreira Leite¹, João Diego de Agostini Losano², Ken Kawaoka Nagai¹,
Raphaella Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Larissa Araújo Stábile¹, Thawan Santana
Piemonte¹, Marcilio Nichi^{1*}

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

² Department of Animal Sciences, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

*e-mail: mnichi@usp.br

A criopreservação espermática é considerada um processo - chave para o uso das biotecnologias reprodutivas em bovinos. No entanto, tal técnica causa redução da qualidade espermática, sendo o estresse oxidativo um dos principais mecanismos envolvidos em injúrias espermáticas pós-descongelamento. Neste contexto, acredita-se que a mitocôndria possua um papel central no desequilíbrio oxidativo durante a criopreservação espermática, por ser a principal fonte liberadora de espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, uma possível alternativa para melhorar a qualidade espermática pós-criopreservação seria uma terapia específica tendo como alvo essa organela. Uma molécula promissora seria o MitoTEMPO, capaz de quelar metais de transição responsáveis pela reação de Fenton, prevenindo a geração do radical hidroxila. Além disso, esta molécula possui papel na matriz mitocondrial com ação mimética de superóxido dismutase, o que, no entanto, pode levar a um acúmulo de peróxido de hidrogênio. Desta forma uma associação com mecanismos voltados ao peróxido de hidrogênio seria necessária (e.g., GSH). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento com o protetor mitocondrial MitoTEMPO, associado ou não à GSH, é capaz de prevenir a produção excessiva de EROS por meio da proteção e manutenção da função mitocondrial, melhorando aspectos quantitativos e qualitativos espermatozoides criopreservados de bovinos. Para tanto, ejaculados de 17 touros (N=17) foram submetidos a criopreservação com diluidores suplementados com diferentes concentrações dos antioxidantes supracitados. Cada ejaculado foi dividido em 8 alíquotas, contendo concentrações crescentes da molécula MitoTEMPO (0, 25, 50 e 100 µM) com ou sem GSH (0 e 5 mM). Após a diluição de cada ejaculado nos meios contendo seus respectivos tratamentos antioxidantes, as amostras foram submetidas à criopreservação, descongelamento e avaliação espermática. Observamos que as amostras tratadas com 50 µM de MitoTEMPO + 5 mM GSH apresentaram redução na porcentagem de células com alta atividade mitocondrial (51.59 ± 3.22) em relação aquelas sem GSH (41.41 ± 2.99). Nesse mesmo grupo houve aumento de ALH (6.08 ± 0.17) em relação ao grupo sem GSH (5.52 ± 0.18) e redução da linearidade (51.06 ± 1.30) em relação ao grupo sem GSH (55.18 ± 1.31). Ainda a associação dos tratamentos com GSH houve aumento de lesão de membrana acrossomal em todas as doses de MitoTEMPO avaliadas. A suplementação somente com o MitoTEMPO não apresentou melhoras significativas na qualidade espermática após a descongelamento. Os resultados do presente estudo indicam que a suplementação com MitoTEMPO e GSH nas doses utilizadas, associados ou não, não melhoram a qualidade espermática após a descongelamento.

Palavras chave: GSH. MitoTEMPO. Estresse redutivo. Antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio.

Effect of mitochondrial therapy on post-thaw sperm quality in bulls

Álvaro de Miranda Alves¹, Roberta Ferreira Leite¹, João Diego de Agostini Losano², Ken Kawaoka Nagai¹,
Raphaella Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Larissa Araújo Stábile¹, Thawan Santana
Piemonte¹, Marcilio Nichi^{1*}

¹Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Sao Paulo

²Department of Animal Sciences, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida

*e-mail: mnichi@usp.br

Sperm cryopreservation is considered a key process for the use of reproductive biotechnologies in cattle. However, this technique causes a reduction in sperm quality, with oxidative stress being one of the main mechanisms involved in post-thaw sperm injuries. In this context, mitochondria are believed to play a central role in oxidative imbalance during sperm cryopreservation, as they are the main source of reactive oxygen species (ROS). Thus, a possible alternative to improve post-thawed sperm quality would be a specific therapy targeting this organelle. A promising molecule would be MitoTEMPO, capable of chelating transition metals responsible for the Fenton reaction, preventing the generation of the hydroxyl radical. Additionally, this molecule plays a role in the mitochondrial matrix with a superoxide dismutase mimetic action, which, however, may lead to hydrogen peroxide accumulation. Thus, an association with mechanisms focused on hydrogen peroxide would be necessary (e.g., GSH). Therefore, the aim of the present study was to evaluate whether treatment with the mitochondrial protector MitoTEMPO, alone or in combination with GSH, is able to prevent excessive ROS production by protecting and maintaining mitochondrial function, improving quantitative and qualitative aspects of cryopreserved bull sperm. For this purpose, ejaculates from 17 bulls (N=17) were subjected to cryopreservation using extenders supplemented with different concentrations of the aforementioned antioxidants. Each ejaculate was divided into 8 aliquots, containing increasing concentrations of the MitoTEMPO (0, 25, 50, and 100 μ M) associated or not with GSH (0 and 5 mM). After dilution of each ejaculate in media containing their respective antioxidant treatments, the samples were subjected to cryopreservation, thawing, and sperm evaluation. We observed that samples treated with 50 μ M MitoTEMPO + 5 mM GSH showed a reduction in the percentage of cells with high mitochondrial activity (51.59 ± 3.22) compared to those without GSH (41.41 ± 2.99). In the same group, there was an increase in ALH (6.08 ± 0.17) compared to the group without GSH (5.52 ± 0.18) and a reduction in linearity (51.06 ± 1.30) compared to the group without GSH (55.18 ± 1.31). Furthermore, the association of treatments with GSH resulted in an increase in acrosomal membrane damage at all evaluated doses of MitoTEMPO. Supplementation with MitoTEMPO alone did not show significant improvements in sperm quality after thawing. The results of the present study indicate that supplementation with MitoTEMPO and GSH at the doses used, either alone or in combination, does not improve sperm quality after thawing.

Keywords: GSH. MitoTEMPO. Reductive stress. Antioxidants. Reactive oxygen species.

Mudanças no padrão de movimento espermático após a capacitação em bovinos por dois sistemas computadorizados de análises espermáticas (CASA)

Fernanda Baatsch Nascimento¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Rubens Paes de Arruda², Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Pirassununga, SP, Brasil

²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Centro de Biotecnologia da Reprodução Animal, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Pirassununga, SP, Brasil

*Correspondência: celeghin@usp.br

Há no mercado diferentes equipamentos que permitem a análise espermática computadorizada (CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis), sendo possível avaliar detalhes do movimento da célula espermática, o que pode ser promissor na avaliação das mudanças no padrão de motilidade de espermatozoides capacitados. No entanto, os equipamentos possuem algumas diferenças na forma de detectar o espermatozoide e no ajuste do setup. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de comparar dois equipamentos, o da Hamilton Thorne, modelo IVOS II (acoplado a um microcomputador), e o iSperm (portátil, acoplado a um tablet), para detectar diferenças na motilidade espermática pós-capacitação em bovinos. Neste estudo foram colhidos três ejaculados de 12 touros (n=36) da raça Nelore. Todos os ejaculados foram analisados logo após a colheita (controle, CO), sendo então submetidos a um protocolo de capacitação espermática *in vitro* e, a seguir, reavaliados (CAP). As amostras foram analisadas nos dois equipamentos, Hamilton Thorne (HT) e iSperm (iS), quanto as seguintes características: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %). O estudo foi delineado em arranjo fatorial 2x2, sendo considerados duas condições espermáticas: CO e CAP x dois equipamentos: HT e iS, totalizando quatro grupos experimentais: COHT (controle por Hamilton Thorne), COiS (controle por iSperm), CAPHT (capacitado por Hamilton Thorne) e CAPiS (capacitado por iSperm). Os dados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, sendo considerada diferença estatística quando $P \leq 0,05$. A MT detectada pelo HT reduziu após a capacitação (COHT= $91.9 \pm 3.459\%$ ^a x CAPHT= $71.43 \pm 18.81\%$ ^b) e não diferiu pela avaliação realizada pelo iS (COiS= $78.114 \pm 10.91\%$ ^b x CAPiS= $72.5 \pm 12.8\%$ ^b). A MP reduziu após a capacitação tanto pelo HT (COHT= $84 \pm 4.26\%$ ^a x CAPHT= $66.03 \pm 18.17\%$ ^b) quanto pelo iS (COiS= $61.057 \pm 9.792\%$ ^b x CAPiS= $54 \pm 13.8\%$ ^c). Foi detectada redução da VCL após a capacitação quando avaliada pelo HT (COHT= $179 \pm 37.63 \mu\text{m/s}$ ^a x CAPHT= $146 \pm 33.03 \mu\text{m/s}$ ^b), mas esta redução não foi detectada pelo iS (COiS= $152.83 \pm 22.27 \mu\text{m/s}$ ^b x CAPiS= $159 \pm 26.4 \mu\text{m/s}$ ^b). Em relação à VSL não foi observada diferença pelo HT antes e após a capacitação espermática (COHT= $118 \pm 20.79 \mu\text{m/s}$ ^a x CAPHT= $104.7 \pm 20.38 \mu\text{m/s}$ ^a), no entanto, o iS detectou redução nesta variável após a capacitação espermática (COiS= $90.771 \pm 16.99\%$ ^b x CAPiS= $89.5 \pm 19.4\%$ ^c). A VAP foi menor pelo HT após a capacitação (COHT= $132 \pm 24.32 \mu\text{m/s}$ ^a x CAPHT= $113.6 \pm 22.38 \mu\text{m/s}$ ^b), mas nenhum efeito foi notado pelo iS (COiS= $97.686 \pm 18.12 \mu\text{m/s}$ ^b x CAPiS= $98.2 \pm 20.7\%$ ^b). A capacitação reduziu ALH pela análise do HT (COHT= $5.45 \pm 1.001 \mu\text{m}$ ^c x CAPHT= $4.591 \pm 1.069 \mu\text{m}$ ^d), mas aumentou pela análise do iS (COiS= $7.9486 \pm 0.963 \mu\text{m}$ ^b x CAPiS= $8.54 \pm 1.02 \mu\text{m}$ ^a). BCF foi menor após a capacitação para HT (COHT= $40.1 \pm 3.929 \text{ Hz}$ ^a x CAPHT= $37.7 \pm 5.051 \text{ Hz}$ ^b), mas não diferiu para iS (COiS= $33.557 \pm 3.498 \text{ Hz}$ ^c x CAPiS= $32 \pm 2.9 \text{ Hz}$ ^c). A LIN foi menor após a capacitação espermática pela avaliação pelo HT (COHT= $68.8 \pm 6.474\%$ ^b x CAPHT= $74.06 \pm 6.928\%$ ^a), mas não pelo iS (COiS= $57.086 \pm 4.889\%$ ^c x CAPiS= $54.5 \pm 5.99\%$ ^c). A STR não diferiu pelo HT após a capacitação (COHT= $88.7 \pm 2.92\%$ ^{ab} x CAPHT= $91.76 \pm 3.134\%$ ^a), mas foi menor após a capacitação pelo iS (COiS= $90.314 \pm 2.311\%$ ^b x CAPiS= $87.7 \pm 3.63\%$ ^c). Com base nos resultados, parece haver diferenças na interpretação da cinética espermática entre os dois equipamentos de análise. Embora ambos foram capazes de detectar diferenças entre os espermatozoides capacitados. Essas diferenças podem ser atribuídas às variações nos métodos de medição e análise de parâmetros como motilidade, velocidade e linearidade dos espermatozoides. Portanto, é importante considerar essas discrepâncias ao interpretar os resultados e ao selecionar o equipamento mais adequado para avaliar a qualidade do sêmen. Mais estudos comparativos entre os dois equipamentos são necessários para uma compreensão mais completa de suas diferenças e semelhanças.

Palavras chave: hiperativação da motilidade; sêmen; cinética espermática; touros.

Agradecimentos: FAPESP (processos nº 2023/01059-0) e CNPq (processo 312510/2021-7).

Changes in sperm movement pattern after capacitation in cattle by two computerized sperm analysis systems (CASA)

Fernanda Baatsch Nascimento¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Rubens Paes de Arruda², Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology, Center for Animal Reproduction Biotechnology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (FMVZ-USP), Pirassununga, SP, Brazil

²Semen Biotechnology and Andrology Laboratory, Center for Animal Reproduction Biotechnology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (FMVZ-USP), Pirassununga, SP, Brazil

*Corresponding author: celeghin@usp.br

Currently, there are different commercial devices for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA), enabling the detailed analysis of sperm movement, which could be promising in evaluating changes in the motility pattern of capacitated spermatozoa. However, these devices vary in their methods of sperm detection and setup adjustments. Therefore, this study aimed to compare two equipment, the Hamilton Thorne IVOS II (connected to a microcomputer) and the iSperm (portable, connected to a tablet), to detect differences in post-capacitation sperm motility in cattle. In this study, three ejaculates were collected from 12 Nelore bulls (n=36). All ejaculates were analyzed immediately after collection (control, CO), then subjected to an *in vitro* sperm capacitation protocol, and then re-evaluated (CAP). The samples were analyzed using both the Hamilton Thorne (HT) and iSperm (iS) equipment for the following characteristics: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), progressive velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), lateral head displacement (ALH, μm), beat cross frequency (BCF, Hz), linearity (LIN, %), and straightness (STR, %). The study was designed in a 2x2 factorial arrangement, considering two sperm conditions: CO and CAP x two equipment: HT and iS, totaling four experimental groups: COHT (control by Hamilton Thorne), COiS (control by iSperm), CAPHT (capacitated by Hamilton Thorne), and CApiS (capacitated by iSperm). Data were subjected to ANOVA, and means were compared using Tukey's test, with statistical difference considered when $P \leq 0.05$. TM detected by HT decreased after capacitation (COHT= $91.9 \pm 3.459\%$ ^a vs CAPHT= $71.43 \pm 18.81\%$ ^b) and did not differ according to iS evaluation (COiS= $78.114 \pm 10.91\%$ ^b vs. CApiS= $72.5 \pm 12.8\%$ ^b). PM decreased after capacitation for both HT (COHT= $84 \pm 4.26\%$ ^a vs. CAPHT= $66.03 \pm 18.17\%$ ^b) and iS (COiS= $61.057 \pm 9.792\%$ ^b vs. CApiS= $54 \pm 13.8\%$ ^c). VCL decreased after capacitation when evaluated by HT (COHT= $179 \pm 37.63 \mu\text{m/s}$ ^a vs CAPHT= $146 \pm 33.03 \mu\text{m/s}$ ^b), but this reduction was not detected by iS (COiS= $152.83 \pm 22.27 \mu\text{m/s}$ ^b vs. CApiS= $159 \pm 26.4 \mu\text{m/s}$ ^b). Regarding VSL, no difference was observed by HT before and after sperm capacitation (COHT= $118 \pm 20.79 \mu\text{m/s}$ ^a vs. CAPHT= $104.7 \pm 20.38 \mu\text{m/s}$ ^a), however, iS detected a reduction in this variable (COiS= $90.771 \pm 16.99\%$ ^b vs. CApiS= $89.5 \pm 19.4\%$ ^c). VAP was lower by HT after capacitation (COHT= $132 \pm 24.32 \mu\text{m/s}$ ^a vs. CAPHT= $113.6 \pm 22.38 \mu\text{m/s}$ ^b), but no effect was noted by iS (COiS= $97.686 \pm 18.12 \mu\text{m/s}$ ^b vs. CApiS= $98.2 \pm 20.7\%$ ^b). ALH was reduced by HT analysis after capacitation (COHT= $5.45 \pm 1.001 \mu\text{m}$ ^c vs. CAPHT= $4.591 \pm 1.069 \mu\text{m}$ ^d) but increased by iS analysis (COiS= $7.9486 \pm 0.963 \mu\text{m}$ ^b vs. CApiS= $8.54 \pm 1.02 \mu\text{m}$ ^a). BCF was lower after capacitation for HT (COHT= $40.1 \pm 3.929 \text{ Hz}$ ^a vs. CAPHT= $37.7 \pm 5.051 \text{ Hz}$ ^b) but did not differ for iS (COiS= $33.557 \pm 3.498 \text{ Hz}$ ^c vs. CApiS= $32 \pm 2.9 \text{ Hz}$ ^c). LIN was lower after sperm capacitation by HT evaluation (COHT= $68.8 \pm 6.474\%$ ^b vs. CAPHT= $74.06 \pm 6.928\%$ ^a) but not by iS (COiS= $57.086 \pm 4.889\%$ ^c vs. CApiS= $54.5 \pm 5.99\%$ ^c). STR did not differ by HT after capacitation (COHT= $88.7 \pm 2.92\%$ ^{ab} vs. CAPHT= $91.76 \pm 3.134\%$ ^a) but was lower after capacitation by iS (COiS= $90.314 \pm 2.311\%$ ^b vs. CApiS= $87.7 \pm 3.63\%$ ^c). Based on the results, there appear to be differences in sperm kinetic interpretation between the two-analysis equipment. Although both were able to detect differences between the capacitated sperm. These differences may be attributed to variations in measurement methods and analysis of parameters such as motility, velocity, and linearity of spermatozoa. Therefore, it is essential to consider these discrepancies when interpreting the results and selecting the most appropriate equipment to assess semen quality. Further comparative studies between the two equipment are necessary for a more comprehensive understanding of their differences and similarities.

Keywords: hyperactivity motility; semen; sperm kinetics; bulls.

Acknowledgment: FAPESP (process n° 2023/01059-0) and CNPq (process n° 312510/2021-7).

Dilatação de mediastino testicular associada a hemospermia em touro: relato de casos

Mariana Karla Francolino da Silva¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Gustavo Henrique Batista Lara³, André Maciel Crespillo^{2,3}

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP; ²Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo/SP; ³Central Bela Vista, Botucatu/SP

*E-mail: marianakfranc@usp.br

Hemospermia refere-se à presença de sangue no sêmen, que pode ser visualizada ao exame macroscópico ou apenas microscopicamente, ocasionando alterações nas características físicas e, eventualmente, na qualidade dos ejaculados. Descrita em todas as espécies domésticas, esta condição pode ser causada por traumas, infecções, afecções vasculares (locais ou sistêmicas), pela presença de tumores no trato reprodutivo e por obstruções ductais testiculares ou epididimárias. Além disso, relatos de caso envolvendo pacientes humanos descrevem a ocorrência de hemospermia associada a processos patológicos com origem no mediastino testicular. Em bovinos as desordens do mediastino são consideradas raras, sendo descritos casos de ectasia tubular da *rete testis* e varicocele intratesticular, esta última representada pela dilatação mediastinal. Dessa forma, o presente relato tem por objetivo descrever a ocorrência de dilatação mediastinal em testículo associada a hemospermia em três touros da raça Nelore, com idade média de 6 anos, alojados em Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS; Central Bela Vista, Botucatu/SP). Todos os animais se encontravam hípidos durante o acompanhamento dos casos, recebendo a mesma dieta balanceada de manutenção (22 kg de matéria natural por trato) duas vezes ao dia. No exame clínico reprodutivo não foram observadas quaisquer alterações testiculares incluindo aderências, presença de sensibilidade dolorosa, alterações de tônus e/ou volume gonadal. Os parâmetros espermáticos das últimas quatro coletas de sêmen que antecederam os diagnósticos se encontraram dentro dos padrões preconizados para a espécie para dois dos três touros, sendo observados para o Reprodutor 1: 56% de motilidade total (MT), 20% de defeitos maiores (DM) e 7% de defeitos menores (dm); para o Reprodutor 2: MT = 62%, DM = 16% e dm = 7%. Já o Reprodutor 3 apresentou MT = 41%, DM = 26% e dm = 9%, estando fora dos valores de referência preconizados pelo CBRA (2013). No entanto, foi constatado que todos os ejaculados colhidos (uso de vagina artificial) apresentaram mesma alteração de coloração, variando de rosa pálido a avermelhado, indicando a contaminação por sangue. Frente ao quadro de hemospermia os reprodutores foram submetidos a exame clínico reprodutivo completo, não sendo observadas quaisquer alterações dignas de nota em prepúcio, pênis, testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias. Ultrassonografia reprodutiva (modo-B e Doppler colorido) foi empregada como exame complementar, não sendo visibilizadas alterações em glândulas sexuais acessórias, epidídimos e cordão espermático. No entanto, nos 3 casos avaliados foi visibilizada presença de área anecogênica unilateral (2 casos na gônada direita, 1 caso na esquerda), alongada, com contornos irregulares em região de mediastino testicular. Não foram observadas evidências de vascularização no interior das áreas anecogênicas durante a avaliação Doppler, sendo encontrados apenas vasos marginais às áreas císticas. Casos semelhantes foram também descritos para pacientes humanos, sendo relatada a presença de estruturas císticas em região mediastinal. No entanto, os casos em humanos não foram associados à ocorrência de hemospermia. Uma possível justificativa para a ocorrência de hemospermia nos casos descritos neste relato pode estar relacionada à própria fisiologia do processo ejaculatório em touros, que ocorre de maneira rápida e extremamente intensa, o que pode ocasionar intensa contração da superfície das áreas císticas, culminando com a ruptura dos pequenos vasos sanguíneos marginais ao mediastino. Não foram encontrados relatos de casos semelhantes em bovinos, não havendo nenhuma indicação de tratamento específico para esse quadro. Por esse motivo, nenhum tratamento foi empregado para os casos de dilatação de mediastino testicular descritos neste relato.

Palavras-chave: testículo, sêmen, ultrassonografia, bovino, andrologia.

Testicular mediastinum dilatation associated with hemospermia in bulls: case report

Mariana Karla Francolino da Silva¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Gustavo Henrique Batista Lara³, André Maciel Crespillo^{2,3}

¹Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP; ²Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo/SP; ³Central Bela Vista, Botucatu/SP
*E-mail: marianakfranc@usp.br

Hemospermia refers to the presence of blood in semen, which can be visualized macroscopically or only microscopically, causing changes in physical characteristics and occasionally in ejaculate quality. Described in all domestic species, this condition can be caused by trauma, infections, vascular disorders (local or systemic), the presence of tumors in the reproductive tract, and obstructive testicular or epididymal ducts. Furthermore, case reports involving human patients describe hemospermia occurring in association with pathological processes originating in the testicular mediastinum. In cattle, disorders of the mediastinum are considered rare and the cases described include tubular ectasia of the rete testis and intratesticular varicocele, which is represented by mediastinal dilation. The present report aims to describe the occurrence of mediastinal dilatation in the testicle associated with hemospermia in three Nelore bulls, with an average age of 6 years, housed at the Semen Collection and Processing Center (SCPC; Central Bela Vista, Botucatu/SP). All animals remained healthy during the follow-up of the cases, receiving the same balanced maintenance diet (22 kg of natural matter per feeding) twice a day. No testicular alterations were observed during the reproductive clinical examination, including adhesions, presence of painful sensitivity, changes in tone and/or gonadal volume. The sperm parameters from the last four semen collections preceding the diagnoses were within the recommended standards for the species for two out of three bulls, as observed for Breeder 1: 56% total motility (TM), 20% major defects (MD), and 7% minor defects (md); for Breeder 2: TM = 62%, MD = 16%, and md = 7%. Breeder 3 presented TM = 41%, MD = 26%, and md = 9%. However, it was found that all collected ejaculates (using artificial vagina) showed the same color alteration, ranging from pale pink to reddish, indicating contamination by blood. The breeders underwent a complete reproductive clinical examination, with no notable alterations observed in the prepuce, penis, testicles, epididymis, and accessory sex glands. Reproductive ultrasound (B-mode and color Doppler) was employed as a complementary examination, with no alterations visualized in accessory sex glands, epididymis and spermatic cord. However, in the 3 cases evaluated, the presence of unilateral anechoic area (2 cases in the right gonad, 1 case in the left) was visualized, elongated, with irregular contours in the region of the testicular mediastinum. No evidence of vascularization within the anechoic areas was observed during Doppler assessment, with only vessels found marginal to the cystic areas. Similar cases have also been described in human patients, with the presence of cystic structures in the mediastinal region. However, cases in humans were not associated with the occurrence of hemospermia. A possible explanation for the occurrence of hemospermia in the cases described in this report may be related to the physiology of the ejaculatory process in bulls, which occurs rapidly and extremely intensely, leading to intense contraction of the surface of the cystic areas, resulting in the rupture of small blood vessels marginal to the mediastinum. No reports of similar cases in cattle were found, with no indication of specific treatment for this condition. Therefore, no treatment was employed for the cases of testicular mediastinal dilatation described in this report.

Keywords: testicle, semen, ultrasonography, bovine, andrology.

Validação da equação de predição de fertilidade e prenhez de IATF utilizado análise convencional e TTR

Dauydisson Antonio Gonzalez Cordeiro^{1,2}, Luiz Carlos Louzada Ferreira³, Juliana Corrêa Borges Silva³, Eliane Viana da Costa e Silva¹, Fabiana de Andrade Melo Sterza^{1,4} *Eriklis Nogueira^{1,3}

¹Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, ²Cia Assessoria Ltda, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, ⁴Programa de Pós Graduação em Zootecnia (PGZOO), ³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil
*e-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

A fertilidade do touro, desempenha um papel crucial no sucesso dos programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Portanto, antecipar a capacidade de prever a fertilidade do touro é altamente desejável, para alcançar taxas de prenhez aceitáveis. Apesar da discussão de sua confiabilidade, as avaliações de sêmen por meio da análise subjetiva (motilidade e vigor ao descongelamento, TTR) tem sido amplamente utilizada. Nesse contexto, o estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a predição da fertilidade (Pred) dos touros utilizados em programas de IA com informações de defeitos maiores e a motilidade observada no TTR rápido (46^o C por 30 min), conforme equação proposta por Sanches et al. (2003) $P(\%) = 49.781 + (0.243 \text{ MOTTTR}) - (0.483 \text{ DEFMAIORES}; R=)$, comparando com a taxa de prenhez real (PIA). Foram avaliados dados de 4 estações reprodutivas, 2020-2024, totalizando 52 touros. e vacas primíparas e múltiparas (n= 3694) em protocolo de IATF de três manejos. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 41^o dias após o D0. As partidas de sêmen foram avaliadas conforme CBRA por um único técnico, e os dados de PIA foram relacionados a partida avaliada. As taxas de prenhez média na inseminação e na predição foram de 51,3% e 47,5%, respectivamente. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre a taxa de prenhez esperada e a taxa de prenhez real (0,2877 entre a PIA e PRED (P=0,042), além de revelar uma correlação negativa entre a PIA e o índice de condição corporal (ECC) das vacas (-0,511 (P=0,002). A motilidade no descongelamento média foi de 44%, defeitos maiores: 14,08%, defeitos totais: 23,5% e motilidade TTR: 18,6%. Os touros foram separados em 3 classes de PIA (Alta=63,9%; Média-54,1%, e Baixa- 44,6%). Dos 52 touros, 16 tiveram a predição muito próxima a prenhez na IATF. Dos 36 touros que diferiram da predição com a prenhez real (variação da prenhez acima de 5%), 9 touros continuaram dentro da mesma classificação. No entanto, 27 touros diferiram entre as taxas de prenhez, sendo que 7 touros obtiveram a prenhez na IATF menor que na predição, e 20 touros a taxa de prenhez na IATF foi maior que na predição, sendo esta categoria a que necessita de mais estudos e entendimento sobre o modelo da equação de predição. Apesar do modelo de predição demonstrar uma correlação com a prenhez, ainda existem diferenças significativas entre as taxas de prenhez previstas e observadas na IATF, especialmente em touros que apresentaram uma prenhez na IATF maior que a predita. Conclui-se que a equação de predição ainda requer mais estudos para melhorar a precisão e se aproximar ainda mais dos resultados reais da IATF, com uma sugestão de variação máxima de 5% entre a previsão e a taxa real de prenhez. Isso ressalta a importância contínua da pesquisa nesta área para aprimorar a capacidade de prever a fertilidade dos touros de forma mais confiável.

Palavras-chave: prenhez, predição, fertilidade,

Agradecimentos: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). À empresa CiaAssessoria LTDA do Brasil por ceder os animais e espaço para realização da pesquisa, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Gado de Corte.

Validation of the TAI fertility and pregnancy prediction equation using conventional analysis and TRT

Dauydisson Antonio Gonzalez Cordeiro^{1,2}, Luiz Carlos Louzada Ferreira³, Juliana Corrêa Borges Silva³, Eliane Viana da Costa e Silva¹, Fabiana de Andrade Melo Sterza^{1,4}, *Ériklis Nogueira^{1,3}

¹Postgraduate Program in Veterinary Sciences, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, ²Cia Assessoria Ltda, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, ⁴Postgraduate Program in Animal Science (PGZOO),

³Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

*E-mail: eriklis.nogueira@embrapa.br

Bull fertility plays a crucial role in the success of Fixed Time Artificial Insemination (FTAI) programs. Therefore, anticipating the ability to predict bull fertility is highly desirable to achieve acceptable pregnancy rates. Despite the discussion of its reliability, semen evaluations through subjective analysis (motility and vigor upon thawing, TTR) have been widely used. In this context, the study was conducted to evaluate the prediction of fertility (Pred) of bulls used in AI programs with information on major defects and the motility observed in the fast TRT (46 C for 30 min), according to the equation proposed by Silva et al. (2003) $P(\%) = 49.781 + (0.243 \text{ MOTRT}) - (0.483 \text{ MAJDEFCT}; R=)$, comparing with the real pregnancy rate (PAI). Data from 4 breeding seasons, 2020-2024, were evaluated, totaling 52 bulls. And primiparous and multiparous cows (n= 3694) in a three-management TAI protocol. A pregnancy diagnosis was made on the 41st day after DO. A single technician evaluated the semen batches according to CBRA, and the PIA data were related to the evaluated batch. The average pregnancy rates in insemination and prediction were 51.3% and 47.5%, respectively. The results showed a positive correlation between the predicted pregnancy rate and the actual pregnancy rate (0.2877 between PAI and PRED (P=0.042), in addition to revealing a negative correlation between PAI and the body condition index (BCS) of cows (-0.511 (P=0.002). Average thawing motility was 44%, major defects: 14.08%, total defects: 23.5%, and TRT motility: 18.6%. The bulls were separated into 3 PAI classes (High=63.9%, Medium-54.1%, and Low-44.6%). Of the 52 bulls, 16 had a very close pregnancy prediction in the IATF. Of the 36 bulls that differed from the actual pregnancy prediction (pregnancy variation above 5%), nine bulls remained within the same classification. However, 27 bulls differed in pregnancy rates, with seven bulls having a TAI pregnancy rate lower than predicted, and 20 bulls having a TAI pregnancy rate higher than predicted, this category requires further studies and an understanding of the prediction equation model. Although the prediction model demonstrates a correlation with pregnancy, there are still significant differences between the predicted and observed IATF pregnancy rates, especially in bulls with higher TAI pregnancies than predicted. It is concluded that the prediction equation still requires further studies to improve accuracy and get accurate closer to the accurate IATF results, suggesting a maximum variation of 5% between the prediction and the actual pregnancy rate. This highlights the continued importance of research in this area to improve the ability to predict bull fertility more reliably.

Keywords: pregnancy, prediction, fertility,

Acknowledgments: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). To the company CiaAssessoria LTDA do Brasil for providing the animals and space to carry out the research, the Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA - Beef Cattle.

Validação da Sonda BODIPY-Cholesterol para avaliação do efluxo de colesterol pós-capacitação espermática de bovinos em microscopia de fluorescência

Gabriel de Miranda Teodoro Soares¹, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Ellen Lara Miguel¹, Caroline de Rosso¹, Alessandra Regina Carrer², Rubens Paes de Arruda², Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; ²Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP-Brasil

*correspondência: celeghin@usp.br

Os espermatozoides devem passar por uma série de eventos bioquímicos, durante o transporte através do trato reprodutivo da fêmea, a fim de serem capazes de fertilizar o oócito. Estes eventos culminam com modificações espermáticas que caracterizam a capacitação espermática; em vista da importância deste evento para a fertilização do oócito, surge, portanto, a necessidade de novas formas de avaliação espermática que possam detectar estes eventos e relacioná-los com o potencial de fertilidade do sêmen. Uma das etapas da capacitação é a depleção do colesterol da membrana plasmática e a redistribuição do colesterol remanescente da região equatorial para apical, permitindo a formação de complexos lipoproteicos de ligação à zona pelúcida (“balsas lipídicas”). Assim, este estudo objetivou propor um protocolo para sêmen bovino com o uso da sonda fluorescente BODIPY-Cholesterol para avaliar o efluxo do colesterol em sêmen bovino pré- e pós-indução da capacitação espermática. Foram utilizados ejaculados de dez touros (n=10). Cada ejaculado foi submetido a análises convencionais (motilidade, vigor, concentração e morfologia). Após, cada amostra foi avaliada em dois momentos: controle (CON) e o induzido à capacitação espermática (CAP), quanto à integridade das membranas plasmática, integridade de membrana acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e efluxo do colesterol de membrana, utilizando-se respectivamente as sondas: Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI), iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) e BODIPY-Cholesterol (Top Fluor® Cholesterol - 810255P). Foram contadas 200 células espermáticas, classificando-as em membrana plasmática íntegra (núcleo marcado em azul pelo H342) ou lesada (núcleo marcado em vermelho pelo PI) utilizando o filtro triplo D-F-R (C58420, apresentando os conjuntos UV-2E/C - DAPI - excitação 340nm e emissão 435-485nm, B-2E/C - FITC - excitação 465-495nm e emissão 515-555nm e G-2E/C - Rhodamine - excitação 540-525nm e emissão 605-655nm), e, ao alternar o filtro simples B-2E/C (excitação 465-495 nm), fez-se a contagem dos espermatozoides fortemente e levemente marcados em verde pelo BODIPY-Cholesterol, no mesmo campo. A capacitação foi induzida em meio capacitante FIV-gotas (contendo TL-stock, gentamicina, piruvato, PHE, heparina e BSA) adicionado de 10mM de ionóforo de cálcio (A23187 - Sigma-Aldrich, C7522) por uma hora. Para a análise estatística foi utilizado o programa SAS versão 9.2 (SAS, 2010). Os dados obtidos foram comparados de acordo com o tratamento: Controle (CON) e Capacitado (CAP) por análise de variância e as médias comparadas com o teste de Tukey. Foram considerados níveis de significância mínima de 5%. Foi notada que a indução da capacitação espermática (CAP) foi eficiente em aumentar (P=0,0029) a população de espermatozoides com membranas plasmática íntegra e acrossomo lesado ou reagido (CON=8,87 ± 6,1% x CAP= 34,78 ± 4,23%), característico de espermatozoides capacitados. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos CON (verde forte= 19,25 ± 4,19% x verde fraco= 22,05 ± 4,78%) e CAP (verde forte= 14,01 ± 2,85% x verde fraco= 29,0 ± 6,31%) para as células marcadas pelo BODIPY-Cholesterol, seja para a população fortemente marcada (P=0,3249), quanto para aquela fracamente marcada (P=0,6042). Também não foram encontradas diferenças para o total de células marcadas em verde pelo BODIPY-Cholesterol (P=0,7238). Portanto, o protocolo de indução da capacitação espermática *in vitro* demonstrou ser eficaz em promover um estado semelhante ao processo *in vivo*. Por sua vez, o BODIPY-Cholesterol, não se mostrou eficiente - visualmente por microscopia de fluorescência - como um marcador de capacitação espermática e de padrão de distribuição de colesterol por meio da fluorescência.

Palavras-chaves: capacitação, colesterol, Bodipy-Cholesterol, fluorescência, microscopia.

Agradecimentos: FAPESP (processos nº 2022/12878-0 e 2023/01059-0) e CNPq (processo 312510/2021-7).

Validation of the BODIPY-Cholesterol Probe for evaluating cholesterol efflux post-sperm capacitation in bovines using fluorescence microscopy

Gabriel de Miranda Teodoro Soares¹, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Ellen Lara Miguel¹, Caroline de Rosso¹, Alessandra Regina Carrer², Rubens Paes de Arruda², Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology - Center for Animal Reproduction Biotechnology - Department of Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; ²Semen Biotechnology and Andrology Laboratory - Center for Animal Reproduction Biotechnology - Department of Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP-Brazil

*corresponding author: celeghin@usp.br

Sperm must go through a series of biochemical events during transport through the female's reproductive tract in order to be able to fertilize the oocyte. These events culminate in sperm modifications that characterize sperm capacitation; In view of the importance of this event for oocyte fertilization, there is therefore a need for new forms of sperm evaluation that can detect these events and relate them to the fertility potential of the semen. One of the stages of capacitation is the depletion of cholesterol from the plasma membrane and the redistribution of the remaining cholesterol from the equatorial to the apical region, allowing the formation of lipoprotein complexes binding to the zona pellucida (lipid rafts). Thus, this study aimed to propose a protocol for bovine semen using the fluorescent probe BODIPY-Cholesterol to evaluate the efflux of cholesterol in fresh bovine semen before and after induction of sperm capacitation. Ejaculates from ten bulls (n=10) were used. Each ejaculate was subjected to conventional analyzes (motility, vigor, concentration and morphology). Afterwards, each sample was evaluated at two moments: control (CON) and sperm capacitation-induced (CAP), regarding the integrity of plasma membranes, acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and membrane cholesterol efflux, using respectively the probes: Hoechst 33342 (H342), propidium iodide (PI), 5,5',6,6' tetrachloro 1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyl carbocyanine iodide (JC-1), fluorescein isothiocyanate conjugated *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA) and BODIPY-Cholesterol (Top Fluor® Cholesterol - 810255P). Were counted 200 sperm cells, classifying them as intact plasma membrane (nucleus marked in blue by H342) or damaged (nucleus marked in red by PI) using the D-F-R triple filter (C58420, presenting the sets UV-2E/C - DAPI - excitation 340nm and emission 435-485nm, B-2E/C - FITC - excitation 465-495nm and emission 515-555nm and G-2E/C - Rhodamine - excitation 540-525nm and emission 605-655nm), and, when alternating the simple filter B-2E/C (excitation 465-495 nm), spermatozoa strongly and lightly marked in green by BODIPY-Cholesterol were counted in the same field. Capacitation was induced in FIV-drops capacitating medium (containing TL-stock, gentamicin, pyruvate, PHE, heparin and BSA) added with 10mM calcium ionophore (A23187 - Sigma-Aldrich, C7522) for one hour. For statistical analysis, the SAS version 9.2 software (SAS, 2010) was used. The data obtained were compared according to the treatment: Control (CON) and Capacitated (CAP) by analysis of variance and the means compared with the Tukey test. Minimum significance levels of 5% were considered. It was noted that the induction of sperm capacitation (CAP) was efficient in increasing (P=0.0029) the population of sperm with intact plasma membranes and damaged or reacted acrosome (CON=8.87 ± 6.1% x CAP= 34.78 ± 4.23%), characteristic of capacitated spermatozoa. No statistical difference was found between the CON (strong green= 19.25 ± 4.19% x weak green= 22.05 ± 4.78%) and CAP (strong green= 14.01 ± 2.85% x green weak= 29.0 ± 6.31%) for cells marked by BODIPY-Cholesterol, whether for the strongly marked population (P=0.3249) or for the weakly marked one (P=0.6042). No differences were found for the total number of cells marked in green by BODIPY-Cholesterol (P=0.7238). Therefore, the in vitro sperm capacitation induction protocol proved to be effective in promoting a state similar to the in vivo process. In turn, BODIPY-Cholesterol did not prove to be efficient - visually by fluorescence microscopy - as a marker of sperm capacitation and cholesterol distribution pattern through fluorescence.

Keywords: capacitation, cholesterol, Bodipy-Cholesterol, fluorescence, microscopy.

Acknowledgments: FAPESP (process 2022/12878-0 and 2023/01059-0) and CNPq (process 312510/2021-7).

Métodos para estocagem dos espermatozoides do epidídimo de touros

Luis Varela Brasileiro de Alcantara^{1*}, Ken Kawaoka Nagai¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Raphaela Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Roberta Ferreira Leite¹, Átila Adão da Rocha Albuquerque¹, Marcilio Nichi¹

¹Laboratório de Andrologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

*e-mail: luis.alcantara@usp.br

O uso de sêmen de touros de alto valor genético é de fundamental importância para o desenvolvimento da pecuária bovina no Brasil, porém estes animais estão sujeitos a diversas fatalidades, acarretando em graves perdas econômicas e genéticas. O uso de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo vem sendo estudado em diversas espécies, pois possibilita a coleta de animais de alto valor genético, mesmo após o óbito. Entretanto, o armazenamento para o transporte continua sendo uma problemática para esta técnica em touros, devido ao distanciamento dos grandes centros urbanos ou a morte inesperada de um indivíduo pode comprometer a qualidade do material até o seu destino final para colheita e criopreservação. Assim, uma alternativa para o armazenamento durante o transporte poderia ser a colheita imediata, seguida de transporte do sêmen refrigerado para um laboratório capacitado. Dessa forma, foi proposto comparar métodos para estocagem de espermatozoides recuperados do epidídimo de testículos de touros provenientes de abatedouro, através da análise da qualidade pós-descongelamento de espermatozoides armazenados a 4°C durante 24 horas no próprio testículo versus armazenados em diluidor. Foram utilizados 4 pares de testículo de touro, provenientes de abatedouro. Os testículos foram distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. Os tratamentos usados para refrigeração dos espermatozoides foram: armazenamento, por 24 horas a 4°C, em fração A (sem glicerol) de tris-gema (Grupo 1); e armazenamento no complexo testículo-epidídimo por 24 horas a 4°C (Grupo 2). As amostras foram analisadas pré refrigeração, para concentração e para motilidade pelo CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) e só foram utilizadas amostras com no mínimo 40% de motilidade. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo através da técnica do fluxo retrogrado. Após a refrigeração, as amostras do grupo 2 foram coletadas e ambos os grupos foram criopreservados. Após uma semana, no mínimo, as amostras foram descongeladas e analisadas para: integridade da membrana plasmática (método eosina-nigrosina); suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo (Ensaio TBARS); análise computadorizada da motilidade (CASA); e avaliação da funcionalidade mitocondrial (método DAB). Os dados foram analisados pelo programa SAS *System for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.), com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A análise descritiva foi realizada utilizando as médias mais ou menos o erro padrão. Não houve diferença entre os tratamentos para DAB, TBARS e eosina/nigrosina ($P > 0,05$). Porém, houve diferença nos parâmetros específicos de motilidade total ($P=0,01$), motilidade progressiva ($P=0,02$), motilidade rápida ($P=0,01$), motilidade média ($P=0,01$), onde o grupo 1 foi superior e houve também alteração na proporção de espermatozoides estáticos ($P=0,01$), onde o grupo 2 teve um valor superior. O presente estudo mostrou que os espermatozoides coletados da cauda do epidídimo, armazenados em diluidor, possuem parâmetros superiores pós criopreservação do que os armazenados no complexo testículo-epidídimo.

Palavras-chave: Epidídimo, criopreservação de sêmen, bovinos.

Methods for storage of bull epididymal spermatozoa

Luis Varela Brasileiro de Alcantara^{1*}, Ken Kawaoka Nagai¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Raphaela Gabrielle Brito Sousa¹, Henrique Thomazo Frias¹, Roberta Ferreira Leite¹, Átila Adão da Rocha Albuquerque¹, Marcilio Nichi¹

¹Laboratório de Andrologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil

*e-mail: luis.alcantara@usp.br

The use of semen from bulls with high genetic value is of fundamental importance for the development of cattle farming in Brazil. However, these animals are subject to various fatalities, resulting in significant economic and genetic losses. The use of spermatozoa from the epididymal tail has been studied in various species as it allows for the collection of animals with high genetic value even after death. However, transportation storage remains problematic for this technique in bulls due to the distance from major urban centers or the unexpected death of an individual, which can compromise the quality of the material until its final destination for collection and cryopreservation. Therefore, an alternative for storage during transportation could be immediate collection followed by transportation of the refrigerated semen to a qualified laboratory. Thus, this study aimed to compare methods for storing spermatozoa recovered from the epididymis of bull testicles from slaughterhouses by analyzing the post-thaw quality of sperm stored at 4°C for 24 hours in the testicle itself versus stored in a diluent. Four pairs of bull testicles from slaughterhouses were used, randomly distributed across treatments. The treatments used for sperm refrigeration were: storage for 24 hours at 4°C in fraction A (without glycerol) of tris-yolk (Group 1); and storage in the testis-epididymis complex for 24 hours at 4°C (Group 2). Samples were analyzed pre-refrigeration for concentration and motility using Computer Assisted Sperm Analysis (CASA), and only samples with a minimum of 40% motility were used. Spermatozoa were collected from the epididymal tail using the retrograde flow technique. After refrigeration, samples from Group 2 were collected, and both groups were cryopreserved. After at least one week, samples were thawed and analyzed for: plasma membrane integrity (eosin-nigrosin method); sperm susceptibility to oxidative stress (TBARS assay); computerized motility analysis (CASA); and evaluation of mitochondrial functionality (DAB method). Data were analyzed using the SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), with a significance level of 5% ($p < 0.05$). Descriptive analysis was performed using means plus or minus the standard error. There was no difference between treatments for DAB, TBARS, and eosin/nigrosin ($P > 0.05$). However, there were differences in specific parameters of total motility ($P=0.01$), progressive motility ($P=0.02$), rapid motility ($P=0.01$), and medium motility ($P=0.01$), where Group 1 was superior, and there was also a change in the proportion of static spermatozoa ($P=0.01$), where Group 2 had a higher value. This study showed that sperm collected from the epididymal tail and stored in a diluent had superior post-cryopreservation parameters compared to those stored in the testis-epididymis complex

Keywords: Epididymis, semen cryopreservation, cattle.

Impacto da presença de bactérias e leveduras no semen congelado bovino sobre a taxa de concepção e perda gestacional em IATF

Gilson Antonio Pessoa¹, Ana Paula Martini², Emídio Ferreira Machado Filho³

¹laboratório de Embriologia Animal (Embryolab Biotechnology)– Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil; ²Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Uruguaiana-RS, Brasil; ³Reprobiomet Consultoria, Santa Maria-RS, Brasil

*e-mail: gilson.pessoa@ufsm.br

O objetivo deste estudo foi avaliar as características de cinética (Motilidade total – MT), funcionalidade de membrana (HOST) e morfologia espermática, fertilidade e perda gestacional em partidas de sêmen bovino com cultura bacteriológica positiva. Para isso, foi realizado exame de cultura bacteriana em dois laboratórios de dois touros (A e B), das raças Braford e Brangus, respectivamente. A análise do sêmen foi realizada em 6 partidas diferentes do touro A (031120, 111120, 131120, 040321, 170521, 210521) e em 3 partidas diferentes do touro B (310322, 250422, 280422). Ambas as partidas foram submetidas a teste de fertilidade a campo, sendo distribuídas aleatoriamente em 2.215 protocolos de IATF numa única fazenda. Os dados foram submetidos a análise estatística através de PROC GLLMIX do SAS. Na análise de cinética espermática, 0h, a MT foi de 68,83% para o touro A e de 53,00% para o touro B (P=0,03). E após o TTR (3h a 37°), a MT do touro A foi de 33,16% e a do touro B de 20,60% (P=0,001). No HOST na 0h o percentual de espermatozoides reagidos foi de 29,00% para o touro A e de 20,33% para o touro B, ao TTR nas 3h observou-se uma queda tanto para o touro A com 18,00% quanto para o touro B com 7,66% (P=0,001). Em relação ao exame morfológico, o percentual total de defeitos foi de 20,08% para o touro A e de 15,16% para o touro B. O exame de cultura bacteriana foi realizado em todas as partidas, o touro A apresentou média de 5.675 UFC e o touro B de 4.390 UFC. Os principais agentes encontrados foram *Cedecea sp.*, *Klebsiella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Providência sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobactéria*, *Acinetobacter sp.* e células leveduriformes. A campo, foram inseminadas 1.778 vacas com o sêmen do touro A e 437 vacas com o sêmen do touro B. A taxa de prenhez (D30), de perda gestacional (D30-D90) e de endometrite para as vacas inseminadas com o sêmen do touro A foram 29,16%, 10,43% e 3,83%; e com o sêmen do touro B foram 31,66%, 18,10% e 5,66%; respectivamente. A partida (170521) com menor taxa de prenhez (0%, 0/128) teve a maior contagem de UFC (12.300 UFC) e a partida (210521) com maior taxa de prenhez (54%, 243/450) teve menor contagem de UFC (0 UFC), ambas do touro A. Os dados do espermograma e prenhez demonstraram declínio nas partidas com maior contagem de bactérias. Houve correlação entre a redução de espermatozoides com membrana funcional e UFC na amostra ($R^2=0,52$). Quanto ao exame morfológico, não se verificou relevante associação com a presença de microrganismos. A presença de bactérias no sêmen pode estar associada a contaminação das amostras durante o processo de produção e acarretar alterações na membrana espermática reduzindo a viabilidade da amostra. Conclui-se que as amostras com alta carga bacteriana no sêmen bovino afeta o desempenho em programas de IATF e compromete a saúde uterina das vacas.

Palavras-chave: Bovino, Contaminação bacteriana, IATF

Impact of the presence of bacteria and yeast in frozen bovine semen on conception rate and gestational loss in FTAI.

Gilson Antonio Pessoa¹, Ana Paula Martini², Emídio Ferreira Machado Filho³

¹laboratório de Embriologia Animal (Embryolab Biotechnology)– Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, ²Universidade Federal do Pampa (Unipampa), Uruguaiana-RS, Brasil ³Reprobiovet Consultoria, Santa Maria-RS, Brasil

*e-mail: gilson.pessoa@ufsm.br

The objective of this study was to assess the kinetic characteristics (Total Motility - TM), membrane functionality (HOST), and sperm morphology, fertility, and gestational loss in bovine semen batches with positive bacteriological culture. To achieve this, bacterial culture examination was conducted in two laboratories for two bulls (A and B) of Braford and Brangus breeds, respectively. Semen analysis was performed on 6 different batches from bull A (031120, 111120, 131120, 040321, 170521, 210521) and 3 different batches from bull B (310322, 250422, 280422). Both batches underwent field fertility testing, being randomly distributed among 2,215 TAI (Timed Artificial Insemination) protocols on a single farm. Data were subjected to statistical analysis using PROC GLLMIX of SAS. In the analysis of sperm kinetics at 0h, TM was 68.83% for bull A and 53.00% for bull B ($P=0.03$). After TTR (3h at 37°C), TM for bull A was 33.16% and for bull B was 20.60% ($P=0.001$). In HOST at 0h, the percentage of reacted spermatozoa was 29.00% for bull A and 20.33% for bull B, while at TTR after 3h, a decrease was observed for both bull A (18.00%) and bull B (7.66%) ($P=0.001$). Regarding morphological examination, the total percentage of defects was 20.08% for bull A and 15.16% for bull B. Bacterial culture examination was conducted on all batches, with bull A averaging 5,675 CFU (Colony Forming Units) and bull B averaging 4,390 CFU. The main agents found were *Cedecea* sp., *Klebsiella* sp., *Staphylococcus* sp., *Providência* sp., *Pseudomonas* sp., *Enterobacter*, *Acinetobacter* sp., and yeast cells. In the field, 1,778 cows were inseminated with semen from bull A and 437 cows with semen from bull B. The pregnancy rate (D30), gestational loss rate (D30-D90), and endometritis rate for cows inseminated with semen from bull A were 29.16%, 10.43%, and 3.83%, respectively, and with semen from bull B were 31.66%, 18.10%, and 5.66%, respectively. The batch (170521) with the lowest pregnancy rate (0%, 0/128) had the highest CFU count (12,300 CFU), and the batch (210521) with the highest pregnancy rate (54%, 243/450) had the lowest CFU count (0 CFU), both from bull A. Spermogram and pregnancy data demonstrated a decline in batches with higher bacterial counts. There was a correlation between the reduction in sperm with functional membrane and CFU in the sample ($R^2=0.52$). As for morphological examination, no significant association with the presence of microorganisms was observed. The presence of bacteria in semen may be associated with sample contamination during the production process and result in alterations in sperm membrane, reducing sample viability. It is concluded that samples with high bacterial load in bovine semen affect performance in TAI programs and compromise the uterine health of cows.

Existe efeito de programação fetal na prole subsequente de machos da raça Nelore sobre a funcionalidade de membrana mitocondrial, ao realizar desmame antecipado e convencional em fêmeas primíparas e múltíparas?

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Guilherme Pugliesi², Júlio Cesar de Carvalho Balieiro³, Alexandre Rossetto Garcia⁴, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁵, Paulo Roberto Leme⁶, Germán Darío Ramirez Zamudio⁶, Giovanna Galhardo Ramos¹, Thiago Kan Nishimura²

¹Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ²Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil

³Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil;

⁴Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil

⁵Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPaR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo - USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ⁶Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brasil

*E-mail: arrudarp@usp.br

Programação fetal refere-se ao conceito no qual fatores que afetam a saúde e o desempenho da mãe gestante podem ter efeitos a longo prazo na prole, por meio de estímulo ou lesão durante períodos críticos da gestação os quais modulam o desenvolvimento fetal e interferem no desempenho da progênie. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do desmame antecipado e convencional sobre a oxidação do citocromo C de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB), a qual caracteriza a funcionalidade da membrana mitocondrial, da prole subsequente de machos, gerada por fêmeas primíparas ou múltíparas. Foram avaliados 56 machos da raça Nelore, com idade média inicial de 12,5 meses. Durante o desenvolvimento fetal destes animais, suas mães, primíparas ou múltíparas, desmamaram bezerros com 150 ou 240 dias (desmame antecipado ou convencional, respectivamente). Desta forma, dos 56 animais que foram utilizados, 29 são provenientes de fêmeas primíparas, sendo 14 do grupo desmame antecipado e 15 do desmame convencional. Os outros 27 animais foram gerados por fêmeas múltíparas, sendo 13 pertencentes ao grupo desmame antecipado e 14 do desmame convencional. As colheitas de sêmen aconteceram aos 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, utilizando a técnica de eletroejaculação. A funcionalidade da membrana mitocondrial foi avaliada pelo teste ultracitoquímico de atividade *in situ* da citocromo C oxidase. Para isso, foi utilizada uma alíquota de 80 µL de sêmen incubada com 80 µL de DAB (diaminobenzidina - 1 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco – DPBS) a 37°C durante uma hora. Após a incubação, foram realizados três esfregaços, os quais foram fixados em formol a 10% durante 10 minutos. As lâminas foram secas no ar sob proteção da luz e depois avaliadas sob microscopia óptica com aumento de 1000x. Foram avaliadas 200 células por amostra e classificadas em quatro classes: DAB I: espermatozoides com peça intermediária totalmente corada, com praticamente todas as mitocôndrias ativas, indicando alta atividade mitocondrial. DAB II: espermatozoides com mais da metade das mitocôndrias coradas, indicando atividade mitocondrial média a alta. DAB III: espermatozoides com menos da metade das mitocôndrias coradas, indicando baixa atividade mitocondrial. DAB IV: espermatozoides com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondria. Os resultados foram expressos em porcentagem de cada subpopulação na amostra. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS (Versão 9.2; SAS Institute), analisados por meio de ANOVA utilizando modelo misto (PROC MIXED). Quando detectado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo método de Fisher de menor diferença significativa para múltiplas comparações. Foram considerados como diferença significativa quando $P \leq 0,05$. Não houve efeito de desmame, mãe, nem interação entre desmame, mãe e idade ($p > 0,05$). Entretanto, houve efeito de idade para potencial de membrana mitocondrial ($p < 0,01$), sendo os dados expressos como média \pm erro padrão da média: DAB I: $40,7^c \pm 3,6$, $62,9^b \pm 2,6$, $70,4^a \pm 2,3$ e $70,3^a \pm 2,1$; DAB II: $39,6^a \pm 2,8$, $28,3^b \pm 2,1$, $21,6^c \pm 1,8$ e $26,4^{bc} \pm 1,6$; DAB III: $9,7^a \pm 0,9$, $2,2^b \pm 0,7$, $1,6^b \pm 0,6$ e $1,1^b \pm 0,5$; DAB IV: $13,6^a \pm 1,8$, $6,6^b \pm 1,4$, $6,5^b \pm 1,2$ e $2,3^c \pm 1,1$ quando avaliados em 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, respectivamente. Os resultados do presente estudo demonstram que realizar o desmame de forma antecipada ou convencional, utilizando duas classes de mães, não promove efeitos sobre a funcionalidade da membrana mitocondrial da prole de machos da raça Nelore. Entretanto, ao avaliar os espermatozoides de animais da raça Nelore, na fase de pré-púberes e púberes, foi possível observar que conforme os animais vão aumentando a idade, a funcionalidade da membrana mitocondrial torna-se melhor. Conclui-se que não houve efeito de programação fetal ao utilizar o desmame antecipado e convencional na prole subsequente de machos da raça Nelore, gerada por mães primíparas ou múltíparas, porém a funcionalidade da membrana mitocondrial adquire maior qualidade, à medida que os machos da raça Nelore vão se tornando mais velhos.

Palavras-Chave: Bovinos, DAB, Nelore.

Agradecimento: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2017/18937-0).

Is there a fetal programming effect in subsequent offspring of Nelore males on mitochondrial membrane functionality, when early and conventional weaning is performed in primiparous and multiparous females?

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Guilherme Pugliesi², Júlio Cesar de Carvalho Balieiro³, Alexandre Rossetto Garcia⁴, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁵, Paulo Roberto Leme⁶, Germán Darío Ramirez Zamudio⁶, Giovanna Galhardo Ramos¹, Thiago Kan Nishimura²

¹Semen Biotechnology and Andrology Laboratory – LBSA, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ²Molecular Physiology and Endocrinology Laboratory – LFEM, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ³Department of Animal Nutrition and Production – VNP, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ⁴Animal Reproduction Laboratory, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brazil; ⁵Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ⁶Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brazil
*E-mail: arrudarp@usp.br

Fetal programming refers to the concept in which factors that affect the health and performance of the pregnant mother can have long-term effects on the offspring, through stimulation or injury during critical periods of gestation, which modulate fetal development and interfere with the performance of the offspring. The aim of this study was to evaluate the effect of early and conventional weaning on cytochrome C oxidation of 3,3'-Diaminobenzidine (DAB), which characterizes the functionality of the mitochondrial membrane, in subsequent male offspring generated by primiparous or multiparous females. Fifty-six Nelore males were evaluated, with an average initial age of 12.5 months. During the fetal development of these animals, their primiparous or multiparous mothers weaned calves at 150 or 240 days (early or conventional weaning, respectively). Thus, of the 56 animals used, 29 came from primiparous females, 14 from the early weaning group and 15 from conventional weaning. The other 27 animals came from multiparous females, 13 from the early weaning group and 14 from conventional weaning. Semen was collected at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, using the electroejaculation technique. The functionality of the mitochondrial membrane was assessed by the ultracytochemical test of in situ cytochrome C oxidase activity. For this, an aliquot of 80 µL of semen incubated with 80 µL of DAB (diaminobenzidine - 1 mg/mL in Dulbecco's phosphate buffered saline - DPBS) at 37°C for one hour was used. After incubation, three smears were taken and fixed in 10% formaldehyde for 10 minutes. The slides were air-dried under protection from light and then evaluated under light microscopy at 1000x magnification. Two hundred cells were evaluated per sample and classified into four classes: DAB I: sperm with a fully stained midpiece, with practically all the mitochondria active, indicating high mitochondrial activity. DAB II: sperm with more than half of the mitochondria stained, indicating medium to high mitochondrial activity. DAB III: sperm with less than half of the mitochondria stained, indicating low mitochondrial activity. DAB IV: sperm with the middle part completely unstained, indicating no mitochondrial activity. The results were expressed as a percentage of each subpopulation in the sample. Statistical analyses were carried out using SAS software (Version 9.2; SAS Institute), analyzed by ANOVA using a mixed model (PROC MIXED). When a significant treatment effect was detected, the means were compared using Fisher's method of least significant difference for multiple comparisons. A significant difference was considered when $P \leq 0.05$. There was no effect of weaning, mother, or interaction between weaning, mother and age ($p > 0.05$). However, there was an age effect for mitochondrial membrane potential ($p < 0.01$), with the data expressed as mean \pm standard error of the mean: DAB I: $40.7^c \pm 3.6$, $62.9^b \pm 2.6$, $70.4^a \pm 2.3$ and $70.3^a \pm 2.1$; DAB II: $39.6^a \pm 2.8$, $28.3^b \pm 2.1$, $21.6^c \pm 1.8$ and $26.4^{bc} \pm 1.6$; DAB III: $9.7^a \pm 0.9$, $2.2^b \pm 0.7$, $1.6^b \pm 0.6$ and $1.1^b \pm 0.5$; DAB IV: $13.6^a \pm 1.8$, $6.6^b \pm 1.4$, $6.5^b \pm 1.2$ and $2.3^c \pm 1.1$ when assessed at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, respectively. The results of this study show that early or conventional weaning, using two classes of mothers, has no effect on the functionality of the mitochondrial membrane in the offspring of Nelore males. However, when evaluating the sperm of Nelore breed animals in the prepubertal and pubertal stages, it was possible to observe that as the animals get older, the functionality of the mitochondrial membrane becomes better. It can be concluded that there was no effect of fetal programming when using early and conventional weaning on the subsequent offspring of Nelore males sired by primiparous or multiparous mothers, but the functionality of the mitochondrial membrane becomes better as the Nelore males get older.

Keywords: Cattle, DAB, Nelore.

Acknowledgments: Grant (2017/18937-0) São Paulo Research Foundation (FAPESP).

A prole de machos da raça Nelore sofre influência da programação fetal sobre a funcionalidade de membrana plasmática, ao realizar desmame antecipado e convencional em fêmeas primíparas e multíparas?

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Guilherme Pugliesi², Júlio Cesar de Carvalho Balieiro³, Alexandre Rossetto Garcia⁴, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁵, Arlindo Saran Netto⁶, Germán Darío Ramirez Zamudio⁶, Giovanna Galhardo Ramos¹, Karine Galhego Morelli²

¹Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ²Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ³Departamento de Nutrição e Produção Animal – VNP, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ⁴Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil; ⁵Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPaR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo -USP, FMVZ, Pirassununga, São Paulo, Brasil; ⁶Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brasil
*E-mail: arrudarp@usp.br

O conceito de programação fetal, refere-se a qualquer estímulo ou lesão durante períodos críticos da gestação que modulam o desenvolvimento fetal e promovem efeitos a longo prazo sobre o desempenho da progênie. Ou seja, algo que ocorre com o feto pode ter consequências na saúde e no bem-estar desse indivíduo quando adulto. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do desmame antecipado e convencional sobre a funcionalidade da membrana plasmática da prole subsequente de machos, gerada por fêmeas primíparas ou multíparas. Foram avaliados 56 machos da raça Nelore, com idade média inicial de 12,5 meses. Durante o desenvolvimento fetal destes animais, suas mães, primíparas ou multíparas, desmamaram bezerros com 150 ou 240 dias (desmame antecipado ou convencional, respectivamente). Desta forma, dos 56 animais que foram utilizados, 29 são provenientes de fêmeas primíparas, sendo 14 do grupo desmame antecipado e 15 do desmame convencional. Os outros 27 animais foram gerados por fêmeas multíparas, sendo 13 pertencentes ao grupo desmame antecipado e 14 do desmame convencional. As colheitas de sêmen aconteceram aos 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, utilizando a técnica de eletroejaculação. A funcionalidade da membrana plasmática foi avaliada pelo teste de resistência osmótica. Para isso, foi previamente preparado uma solução hiposmótica a base de citrato de sódio (7,35 g) e frutose (13,51 g) diluídos em 1000 mL de água destilada e deionizada (150 mOsm/kg). Após a colheita de sêmen, amostras de 40 µL de sêmen foram adicionadas a 960 µL da solução hiposmótica e incubadas durante 60 minutos. Posteriormente foram acrescentados 500 µL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco - DPBS a 4% de formaldeído pré-aquecido a 37°C. Para a leitura 10 µL da solução final foram colocadas entre lâmina de 25 x 76 mm e lamínula de 22 x 22 mm, previamente limpas. Foram avaliadas 200 células em microscopia de contraste de fase sob aumento de 400x, sendo classificadas células com enrolamento da cauda e células com cauda reta. Para obtenção dos resultados foram retirados os valores das anormalidades morfológicas de cauda. O resultado final foi expresso em porcentagem de células com enrolamento da cauda, ou seja, com membrana plasmática funcional. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS (Versão 9.2; SAS Institute), analisados por meio de ANOVA utilizando modelo misto (PROC MIXED). Quando detectado efeito significativo de tratamento, as médias foram comparadas pelo método de Fisher de menor diferença significativa para múltiplas comparações. Foram considerados como diferença significativa quando $P \leq 0,05$. Não houve efeito principal de desmame, mãe, idade ou interação ($p > 0,05$) para funcionalidade de membrana plasmática. Tal resultado demonstra que realizar desmame de forma antecipada ou convencional em ambas as classes de mães, não promove efeito de programação fetal na prole subsequente de machos da raça Nelore. Entretanto, de forma geral, machos da raça Nelore, ao começarem a apresentar espermatozoides em seus ejaculados, mesmo que não de forma qualitativa e quantitativa para serem classificados como púberes, possuem a membrana plasmática funcional, diferente de outras características já muito estudadas, como motilidade ou morfologia espermática, as quais vão adquirindo melhor qualidade conforme os animais vão se desenvolvendo e amadurecendo reprodutivamente. Conclui-se que não houve efeito de programação fetal ao utilizar o desmame antecipado e convencional na prole subsequente de machos da raça Nelore, gerada por mães primíparas ou multíparas na funcionalidade da membrana plasmática.

Palavras-Chave: Bovinos, Hiposmótico, Nelore.

Agradecimento: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2017/18937-0).

Is there a fetal programming effect in subsequent offspring of Nelore males on mitochondrial membrane functionality, when early and conventional weaning is performed in primiparous and multiparous females?

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Guilherme Pugliesi², Júlio Cesar de Carvalho Balieiro³, Alexandre Rossetto Garcia⁴, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁵, Arlindo Saran Netto⁶, Germán Darío Ramirez Zamudio⁶, Giovanna Galhardo Ramos¹, Karine Galhego Morelli²

¹Semen Biotechnology and Andrology Laboratory – LBSA, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ²Molecular Physiology and Endocrinology Laboratory – LFEM, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ³Department of Animal Nutrition and Production – VNP, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ⁴Animal Reproduction Laboratory, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brazil; ⁵Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ⁶Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brazil
*E-mail: arrudarp@usp.br

The concept of fetal programming refers to any stimulus or injury during critical periods of pregnancy that modulates fetal development and has long-term effects on the performance of the offspring. In other words, something that happens to the fetus can have consequences for the health and well-being of that individual as an adult. The aim of this study was to evaluate the effect of early and conventional weaning on the functionality of the plasma membrane of subsequent male offspring, generated by primiparous or multiparous females. Fifty-six Nelore males were evaluated, with an average initial age of 12.5 months. During the fetal development of these animals, their primiparous or multiparous mothers weaned calves at 150 or 240 days (early or conventional weaning, respectively). Thus, of the 56 animals used, 29 came from primiparous females, 14 from the early weaning group and 15 from conventional weaning. The other 27 animals came from multiparous females, 13 from the early weaning group and 14 from conventional weaning. Semen was collected at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, using the electroejaculation technique. The functionality of the plasma membrane was assessed using the osmotic resistance test. To do this, a hyposmotic solution was previously prepared based on sodium citrate (7.35 g) and fructose (13.51 g) diluted in 1000 mL of distilled and deionized water (150 mOsm/kg). After semen collection, samples of 40 µL of semen were added to 960 µL of the hyposmotic solution and incubated for 60 minutes. Subsequently, 500 µL of 4% formaldehyde Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) pre-warmed to 37°C were added. For the reading, 10 µL of the final solution were placed between a 25 x 76 mm slide and a 22 x 22 mm coverslip. 200 cells were evaluated under phase contrast microscopy at 400x magnification, and cells with curled tails and cells with straight tails were classified. To obtain the results, the values of the morphological abnormalities of the tail were removed. The final result was expressed as a percentage of cells with tail curling, i.e. with a functional plasma membrane. Statistical analyses were carried out using SAS software (Version 9.2; SAS Institute), analyzed by ANOVA using a mixed model (PROC MIXED). When a significant treatment effect was detected, the means were compared using Fisher's method of least significant difference for multiple comparisons. A significant difference was considered when $P \leq 0.05$. There was no main effect of weaning, mother, age or interaction ($p > 0.05$) for plasma membrane functionality. This result shows that early or conventional weaning in both classes of mothers does not have a fetal programming effect on the subsequent offspring of Nelore males. However, in general, Nelore males, when they begin to present sperm in their ejaculates, even if not qualitatively and quantitatively enough to be classified as pubescent, have a functional plasma membrane, unlike other characteristics that have already been studied extensively, such as sperm motility or morphology, which acquire better quality as the animals develop and mature reproductively. It can be concluded that there was no effect of fetal programming when using early and conventional weaning on the subsequent offspring of Nelore males sired by primiparous or multiparous mothers in terms of plasma membrane functionality.

Keywords: Cattle, Hyposmotic, Nelore.

Acknowledgement: Grant (2017/18937-0) São Paulo Research Foundation (FAPESP).

Efeito da DEP's de progenitores de novilhas nelore na prenhez precoce após IATF

Amanda Alves Rosa Taveira^{1*}, Yasmin Silva de Freitas¹, Paulo Semidei², Juan Cuevas de Alvarenga Martins¹, Aline Regina Onori do Nascimento¹, Rafael Guimarães Barbosa³, Luiz Carlos Louzada Ferreira³, Rafael Batista Trannin³, Ériklis Nogueira¹⁴

¹Pós-Graduação em Ciências Veterinárias-CIVET, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, ² Programa PIBIC-CnPQ-EMBRAPA; ³Cia Assessoria Ltda, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, ⁴Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil
*e-mail: amandaalvesrt@gmail.com

A escolha de touros para produção de fêmeas nelore precoces é de extrema importância, e as características de perímetro escrotal ao sobreano (PES), idade ao primeiro parto (IPP) e espessura de gordura subcutânea (EGS) são importantes para aumento da chance dessas novilhas emprenharem precocemente. Assim, o objetivo foi analisar os resultados relacionados à taxa de prenhez na primeira Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) de novilhas precoces (14 meses) com base nas DEP's dessas características. Foi utilizado uma base de dados de novilhas desafiadas a IATF na estação de monta 2022-2023 e 2023-2024 de uma propriedade localizada no município de Rio Negro, MS. Foram coletados dados de 394 novilhas (idade= 14,5 ± 1,01 mês; peso inicial= 294,2 ± 23,5 kg) e 12 touros. Para analisar as DEP's e percentil no programa Embrapa-Genepplus dos touros progenitores dessas novilhas utilizou-se o aplicativo GPplus Nelore para dividir os animais em dois grupos, sendo o G1- fêmeas que os pais eram TOP 0,1 a 10% e G2- novilhas que os pais eram TOP >10% para cada DEP. O n amostral: para PES foi de 119 para o G1 e 275 para o G2, IPP- 120 para G1 e 274 para G2 e EGS- 343 para G1 e 51 para G2. A análise de variância foi utilizada para a estatística através do software SAS (STAT, 9.2) pelo procedimento GLIMMIX. Os resultados relacionando a taxa de prenhez a primeira IATF com as DEP's, mostraram que para as características de PES, o G1 apresentou maior taxa de prenhez a primeira IATF (57,9%) que o G2 (46,9%, P<0,05). Em relação às DEP's de IPP, a taxa de prenhez foi de 57,5% para o G1 e 47,0% para o G2 (P=0,03). Já a EGS, o G1 apresentou taxa de prenhez de 48,6% contra 60,7% do G2, sem diferença significativa (P=0,06). Esses resultados indicam que a escolha de touros com DEP's favoráveis para PES e IPP pode contribuir para a precocidade sexual das novilhas e, conseqüentemente, para uma maior taxa de prenhez na primeira IATF. No entanto, a DEP para EGS não mostrou diferença significativa em relação à prenhez de IATF neste estudo.

Palavras-chave: Diferença esperada na progênie, precocidade, touros.

EPDs of Nelore heifers parents effects on early pregnancy after TAI.

Amanda Alves Rosa Taveira^{1*}, Yasmin Silva de Freitas¹, Paulo Semidei², Juan Cuevas de Alvarenga Martins¹, Aline Regina Onori do Nascimento¹, Rafael Guimarães Barbosa³, Luiz Carlos Louzada Ferreira³, Rafael Batista Trannin³, Ériklis Nogueira¹⁴.

¹Pós-Graduação em Ciências Veterinárias-CIVET, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, ² Programa PIBIC-CnPQ-EMBRAPA; ³Cia Assessoria Ltda, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, ⁴Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil
*e-mail: amandaalvesrt@gmail.com

The choice of bulls for the production of precocious Nelore females is extremely important, and the characteristics of yearling scrotal perimeter (PES), age at first calving (IPP) and subcutaneous fat thickness (EGS) are important to increase the chance of these heifers become pregnant early. Thus, the objective was to analyze the results related to the pregnancy rate in the first Fixed Time Artificial Insemination (TAI) of precocious heifers (14 months) based on the EPDs of these characteristics. A database of heifers enrolled to TAI in the 2022-2023 and 2023-2024 breeding season from a property located in the municipality of Rio Negro, MS, was used. Data were collected from 394 heifers (age= 14.5 ± 1.01 months; initial weight= 294.2 ± 23.5 kg) and 12 Nelore bulls. To analyze the EPD's and percentile in the Embrapa-Geneplus program of the parent bulls of these heifers, the GPplus Nelore application was used to divide the animals into two groups, G1 - females whose parents were TOP 0.1 to 10% and G2 - heifers whose parents were TOP >10% for each EPD. The sample number: for PES was 119 for G1 and 275 for G2, IPP- 120 for G1 and 274 for G2; and EGS- 343 for G1 and 51 for G2. Analysis of variance was used for statistics using SAS software (STAT, 9.2) using the GLIMMIX procedure. The results relating the pregnancy rate at the first TAI with the EPDs, showed that for the PES characteristics, G1 had a higher pregnancy rate at the first TAI (57.9%) than G2 (46.9%, P <0.05). In relation to IPP EPDs, the pregnancy rate was 57.5% for G1 and 47.0% for G2 (P=0.03). As for EGS, G1 presented a pregnancy rate of 48.6% compared to 60.7% in G2, with no significant difference (P=0.06). These results indicate that the choice of bulls with favorable EPDs for PES and IPP can contribute to the sexual precocity of heifers and, consequently, to a higher pregnancy rate in the first TAI. However, EGS EPD did not show a significant difference in relation to TAI pregnancy in this study.

Keywords: Expected difference in progeny, precocious , bulls.

Avaliação do índice de qualificação genética (IQG) de bezerros nascidos a partir de transferência de embriões, inseminação artificial ou monta natural

Aline Regina Onori do Nascimento¹, Amanda Alves Rosa Taveira¹, Juan Cuevas de Alvarenga Martins¹, Juliana Bonato¹, Alessandra Corallo Nicacio², Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes², Ivan Carvalho Filho³, Fabio Luis Buranelo Toral⁴, Ériklis Nogueira^{1,2*}

¹Programa de Pós graduação CIVET-UFMS - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, ²EMBRAPA Gado de Corte – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, ³Genecista do Programa Embrapa Geneplus, ⁴UFMG
E-mail: alineonori@icloud.com

O bom desempenho reprodutivo de bovinos de corte está intimamente ligado às tecnologias adotadas para reprodução. Em combinação com isso, tecnologias que permitem a utilização de acasalamento dirigido prometem entregar progênie com superioridade genética. O Programa Embrapa-Geneplus utiliza um índice (índice de qualificação genética-IQG), para expressar as principais características genéticas de um animal. Ele é calculado com base nas estimativas dos valores genéticos (DEPs) ponderadas pelos respectivos graus de importância na composição do objetivo geral de seleção, visando a classificação da contribuição genética de um animal de forma abrangente e facilitando a tomada de decisões dos criadores. Assim, esse trabalho objetivou avaliar as diferenças de IQG nos grupos de bezerros nascidos e avaliados pelo Programa Embrapa-Geneplus de 5 das safras (2018 à 2023) a partir de diferentes estratégias (ou biotécnicas) reprodutivas, quais sejam: Produção embriões (PIVE-TE), Inseminação Artificial-IA (convencional e IATF), e Monta Natural (MN), sendo avaliados dados de 379.846 animais nascidos. Os Dados Foram distribuídos em grupos contemporâneos de Bezerros nascidos por: PIVE-TE (n= 97743; 25,73%), IA (n= 217794; 57,34%), e MN (n=64310;16,93%). Realizou-se análise estatística pelo programa SAS System. A média de IQG foi maior nos animais nascidos da PIVE-TE (27,21 ± 12,8.), intermediário nos animais nascidos de IA (19,13 ± 10,8), e inferior nos nascidos de MN (9,73 ± 10,2; P<0,0001). Em relação ao sexo dos bezerros, o IQG foi maior nos machos em relação as fêmeas (19,82 e 19,39, respectivamente, P<0,0001). Já em relação a genotipagem, os bezerros genotipados apresentaram maiores valores de IQG, em relação aos não genotipados (28,98 e 14,92 respectivamente, P<0,0001). Concluiu-se que os selecionadores utilizam as ferramentas de seleção disponibilizadas pelo programa Embrapa Geneplus e utilizam a PIVE-TE para multiplicar os animais de maiores méritos genéticos. Em relação aos animais genotipados ou não, há diferença expressiva de 14,06 nos valores de IQG, com superioridade dos primeiros, o que demonstram que animais genotipados não representam uma amostra ao acaso da base genética do programa.

Palavras-chave: Bezerros, Biotecnologia de reprodução, Progênie.

Agradecimentos: À Fundação de Apoio à Pesquisa Agropecuária e Ambiental – FUNDAPAM.

Evaluation of the genetic qualification index (IQG) of calves born from embryo transfer, artificial insemination or natural breeding

Aline Regina Onori do Nascimento¹, Amanda Alves Rosa Taveira¹, Juan Cuevas de Alvarenga Martins¹, Juliana Bonato¹, Alessandra Corallo Nicacio², Gilberto Romeiro de Oliveira Menezes², Ivan Carvalho Filho³, Fabio Luis Buranelo Toral⁴, Ériklis Nogueira^{1,2*}

¹Programa de Pós graduação CIVET-UFMS - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, ²EMBRAPA Gado de Corte – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, ³Genecista do Programa Embrapa Geneplus, ⁴UFMG
E-mail: alineonori@icloud.com

The reproductive performance of beef cattle is highly dependent on the reproductive technologies used. Directed mating technologies can be used to produce offspring with superior genetics. The Embrapa-Geneplus Program uses a genetic qualification index (IQG) that expresses the main genetic characteristics of animal. The IQG is calculated based on genetic value estimates (EPDs) that are weighted by their respective degrees of importance in the general selection objective. This helps classify an animal's genetic contribution and facilitates breeders' decision-making. This study aimed to evaluate the differences in IQG in groups of calves born and evaluated by the Embrapa-Geneplus Program from 5 harvests (2018 to 2023) based on different reproductive strategies, namely: Embryo production (IVP-MOET), Artificial Insemination (AI – both conventional and IATF), and Natural Breeding (NB). The study included data from 379,846 animals born, which were distributed into contemporary groups of calves born by IVP-MOET (n = 97743; 25.73%), AI (n = 217794; 57.34%), and NB (n = 64310; 16.93%). Statistical analysis was performed using the SAS System program. The study found that the average IQG was highest in animals born from IVP-MOET (27.21 ± 12.8), intermediate in animals born from AI (19.13 ± 10.8), and lowest in those born from NB (9.73 ± 10.2 ; $P < 0.0001$). Additionally, male calves had higher IQG values compared to female calves (19.82 and 19.39, respectively, $P < 0.0001$). Furthermore, genotyped calves had higher IQG values compared to non-genotyped calves (28.98 and 14.92 respectively, $P < 0.0001$). It was concluded that selectors used the selection tools made available by the Embrapa Geneplus Program and use IVP-MOET to multiply animals with the greatest genetic merits. The study also shows that there is a significant difference of 14.06 in the IQG values between genotyped and non-genotyped animals. This indicates that genotyped animals have higher rates and do not represent a random sample of the genetic basis of the program.

Keywords: Calves, Reproduction biotechnology, Progeny.

Uso comercial de sêmen refrigerado de touro Nelore com alto mérito genético fora do padrão de criopreservação em protocolo de IATF

Juliana Corrêa Borges Silva^{1*}, André Maciel Crespilho², Advanildo Gonçalves³, Márcio Ribeiro Silva^{3,4}

¹Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; ²Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil; ³Katayama Agropecuária, Guararapes, SP, Brasil; ⁴Melhora Animal Consultoria, Jaboticabal, SP, Brasil

*E-mail: juliana.correa@embrapa.br

Com a finalidade de aumentar a taxa de prenhez, o sêmen refrigerado comparado ao sêmen congelado vem sendo utilizado com eficácia, capaz de proteger a estrutura dos espermatozoides das crioinjúrias, nas mesmas condições de qualidade e concentração espermática. No entanto, um touro Nelore de alto interesse genético e com alta demanda comercial, por não ter sêmen congelado disponível, em decorrência da não liberação das doses ao final do processo de criopreservação, ou seja, fora dos padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), foi utilizado em protocolos de IATF com o sêmen refrigerado. Na fazenda localizada em Goiás, em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0 do protocolo) todas as 179 vacas Nelore multíparas receberam 2 mg de benzoato do estradiol (RIC-BE[®], Syntex, Argentina) e um dispositivo intravaginal de progesterona (PRIMER[®], Tecnopec, Brasil). No Dia 8, o dispositivo de progesterona foi removido e administrou-se 150 µg de d-Cloprostenol (Prolise[®], i.m., ARSA, Argentina), 300 UI de eCG (Folligon 5000[®], i.m., Intervet, Holanda) e 1 mg de benzoato do estradiol. No Dia 10 foi procedida a IATF, na janela de 44 a 48 horas após a retirada do dispositivo. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia 45 dias após a IATF (DP 2200 VET[®], Mindray, China). Foram utilizadas duas partidas de sêmen desse touro, sendo uma criopreservada (o proprietário possuía doses guardadas do mesmo animal) e a outra refrigerada a 5°C, por 24 horas, ambas em palhetas fina, com mesmo diluidor (Central Bela Vista, Botucatu - SP). O sêmen refrigerado foi coletado no dia anterior da IATF, na Central Bela Vista (Botucatu) e foi transportado até Goiás. A partida do sêmen criopreservado estava dentro do padrão do CBRA (mínimo de 70% motilidade e 3 de vigor espermático e máximo de 30% de defeitos totais), já a partida do sêmen refrigerado não estava nos padrões (Mot=60%, vig=3, concentração/dose= 40 milhões, DT=41%, DMA=33% [acrossoma=3%, cabeça isolada anormal=1%, piriforme= 3%, peça intermediária= 12%, cauda fortemente dobrada= 12%, cauda dobrada com gota= 2%], DME=8% [delgado= 2%, cabeça isolada normal= 5%, cauda enrolada=1%]). A análise estatística foi realizada por comparação de médias pelo teste QuiQuadrado. A prenhez do lote foi de 31,3% (56/179), com o sêmen refrigerado (29,13%, 37/127) e não diferiu do sêmen criopreservado (36,54%, 19/52) (P>0,05). Houve diferença entre doses quanto às patologias espermáticas (P<0,05). Concluímos que o uso do sêmen refrigerado se torna uma alternativa interessante, visto que possibilita a utilização de touros de alta demanda genética e comercial, ainda que o sêmen esteja fora dos padrões preconizados para o processo de criopreservação. Nestes casos específicos, esta estratégia pode repercutir em ganhos genéticos e produtivos advindos das progêneses desses reprodutores.

Palavras-chave: Processamento de sêmen, taxa de prenhez, qualidade espermática.

Commercial use of Nelore bulls cooled semen with high genetic merit outside the cryopreservation standard in an FTAI protocol

Juliana Corrêa Borges Silva¹, André Maciel Crespilho², Advanildo Gonçalves³, Márcio Ribeiro Silva^{3,4}

¹Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil; ²Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brazil; ³Katayama Agropecuária, Guararapes, SP, Brazil; ⁴Melhore Animal Consultoria, Jaboticabal, SP, Brazil
*E-mail: juliana.correa@embrapa.br

In order to increase the pregnancy rate, cooled semen has been used effectively compared to frozen semen, be able to protecting the structure of the sperm from cryoinjury, under the same conditions quality and concentration semen. However, a specific Nelore bull, of high genetic interest and with high commercial demand, because frozen semen was not available due to the doses not being released at the cryopreservation process, i.e. outside the standards of the Brazilian College of Animal Reproduction (CBRA), was used in FTAI protocols with cooled semen. At the farm located in Goiás, on a random day of the estrous cycle (Day 0 of the protocol) all 179 multiparous Nelore cows received 2 mg of oestradiol benzoate (RIC-BE®, Syntex, Argentina) and an intravaginal progesterone device (PRIMER®, Tecnopec, Brazil). On Day 8, the progesterone device was removed and 150 µg of d-Cloprostenol (Prolise®, i.m., ARSA, Argentina), 300 IU of eCG (Folligon 5000®, i.m., Intervet, Netherlands) and 1 mg of oestradiol benzoate were administered. On Day 10, IATF was carried out in the window of 44 to 48 hours after removing the device. Pregnancy was diagnosed using ultrasound 45 days after IATF (DP 2200 VET®, Mindray, China). Two semen samples were used from this bull, one of which was cryopreserved (the owner had stored doses from the same animal) and the other cooled at 5°C for 24 hours, both in the same extender, into straws 0.25 mL (Central Bela Vista, Botucatu - SP). The cooled semen was collected the day before FTAI at Central Bela Vista (Botucatu) and transported to Goiás. The sample of the cryopreserved semen was in the CBRA standards (minimum 70% motility and 3 sperm vigor and maximum 30% total defects), while the sample cooled semen was not into the standards (Mot=60%, vig=3, concentration/dose= 40 million, TD=41%, MaD=33% [acrosome=3%, abnormal isolated head=1%, pyriform= 3%, intermediate piece= 12%, strongly bent tail= 12%, bent tail with drop= 2%], MiD=8% [slender= 2%, normal isolated head= 5%, curled tail=1%]). Statistical analysis was performed using the Chi-squared test. The total pregnancy rate in FTAI was 31.3% (56/179), with cooled semen was 29.13% (37/127) and did not differ from cryopreserved semen (36.54%, 19/52) (P>0.05). There was difference between samples to sperm morphologies (P<0.05). We conclude that use of cooled semen is an interesting alternative, as it makes it possible to use bulls with high genetic and commercial demand, even so the semen is not up to the standards recommended for the cryopreservation process. In these specific cases, this strategy can contribute in terms of genetic and productive gains, from the offspring these sires.

Keywords: semen process, pregnancy rate, sperm quality.

Utilização de diluentes com e sem gema de ovo na criopreservação de sêmen bubalino: um estudo preliminar

Rogério Araújo de Almeida Filho¹; Luan Sitó da Silva¹; Luiz Gustavo Ferreira de Lima¹; Eunice Oba¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu/SP
e-mail: eunice.oba@unesp.br

A IA e a criopreservação do sêmen de búfalos são tão almeçadas quanto a de bovinos, já que esses animais ganharam destaque para produção de leite e carne, porém, durante a criopreservação há preocupação em certificar a qualidade do sêmen, levando em consideração aspectos morfológicos e desprezando interferências climáticas sobre o mesmo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a efeito de meio diluente com gema e sem gema de ovo na criopreservação de sêmen bubalino. Foram utilizados dez búfalos da raça Murrah, com idade média de 5 anos, peso médio de 450kg e escore de condição corporal 4. O sêmen foi colhido por massagem transretal das ampolas do ducto deferente. Foram colhidos 22 ejaculados totais com sucesso e 46 tentativas falhas de coleta entre os meses de agosto de 2023 e março de 2024. Após avaliação subjetiva, apenas ejaculados com motilidade total (MT) de $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 e concentração mínima de 300×10^6 SPTZ/mL seguiram para o processo de criopreservação. Cada ejaculado dos animais foi dividido em dois grupos distintos, onde o grupo A recebeu o meio diluente BotuBov[®] (gema de ovo - Botupharma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brasil) e o grupo B recebeu o meio diluente comercial a base de lipossoma (OptiXcell[®] 2 (1/3) e água ultrapura (2/3) - IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brasil). O sêmen foi envasado em palhetas francesas e refrigerados à 5,0 °C por 4 horas, colocadas em vapor de nitrogênio -120,0 °C por 20 minutos e depois submergida em nitrogênio líquido à -196,0 °C. O descongelamento das palhetas foi à 37 °C por 30 segundos e realizada avaliação de cinética espermática computadorizada (CASA - Hamilton Thorn Research – IVOS[®] 12, Beverly, Massachusetts, USA) previamente ajustado para análise seminal de bovinos. A normalidade dos dados testada por meio do teste de Shapiro-Wilk, as médias foram comparadas por meio do teste T e os valores expressos em média \pm desvio padrão. Foi observado diferença significativa ($P < 0,05$) nas amostras de sêmen diluídos do grupo A em relação ao grupo B sobre os valores de velocidade curvilínea (VCL), frequência de batimento de cauda (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), porcentagem de espermatozoides com movimento lento (SLOW), respectivamente, em que: $109 \pm 24,9$ e $138,5 \pm 62,8$ (VCL); $30,9 \pm 5,5$ e $24,8 \pm 9,6$ (BCF); $87,1 \pm 7$ e $73,8 \pm 18,5$ (STR); $57,8 \pm 10,3$ e $46,1 \pm 13,3$ (LIN); $5,6 \pm 6,1$ e $7,7 \pm 6,7$ (SLOW). Não foi observado diferença significativa para os valores de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade média da trajetória (VAP) velocidade curvilínea (VCL), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP) e porcentagem de espermatozoides com movimento médio (MED), respectivamente, em que: $16,4 \pm 17,3$ e $14,7 \pm 13,7$ (MT); $11,4 \pm 11,9$ e $8,2 \pm 8,1$ (MP); $66,2 \pm 14,8$ e $75,3 \pm 31,1$ (VAP); $57,9 \pm 12,7$ e $56,9 \pm 21$ (VSL); $4,5 \pm 1,4$ e $5,3 \pm 2,8$ (ALH); $12,4 \pm 12,7$ e $11,8 \pm 11,2$ (RAP); $4,1 \pm 6,7$ e $3,1 \pm 3,0$ (MED). Após o teste de termoresistência de três horas, as diferenças significativas ($P < 0,05$) se mantiveram apenas para linearidade nas amostras de sêmen quando diluído com meio diluente BotuBov[®] e o diluente a base de lipossoma. Mesmo com dados a favor do diluente a base de gema de ovo, as amostras de sêmen contendo diluente a base de lipossomas podem ser uma alternativa viável para criopreservação de sêmen bubalino coletado por massagem transretal, sendo uma alternativa ao uso de vagina artificial, que demanda condicionamento animal. Conclui-se que neste trabalho o diluente a base de gema de ovo é superior em relação ao diluente contendo lipossomas quanto aos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo CASA em touros coletados por massagem das glândulas sexuais acessórias.

Palavras-chave: avaliação espermática, búfalo, crioprotetor, lipossoma

Utilization of diluents with and without egg yolk in the cryopreservation of buffalo semen: a preliminary study

Rogério Araújo de Almeida Filho¹; Luan Sitó da Silva¹; Luiz Gustavo Ferreira de Lima¹; Eunice Oba¹

¹Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu/SP
e-mail: eunice.oba@unesp.br

The artificial insemination (AI) and semen cryopreservation of buffaloes are as sought after as those of cattle, as these animals have gained prominence in milk and meat production. However, during cryopreservation, there is concern regarding certifying semen quality, taking into consideration morphological aspects and disregarding climatic interferences. The aim of this study was to evaluate the effect of diluent medium with egg yolk and without egg yolk on the cryopreservation of buffalo semen. Ten Murrah buffaloes, with an average age of 5 years, average weight of 450 kg, and body condition score of 4 were used. Semen was collected by transrectal massage of the ampullae of the vas deferens. Twenty-two successful total ejaculates and 46 failed collection attempts were obtained between August 2023 and March 2024. After subjective evaluation, only ejaculates with total motility (TM) of $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 , and a minimum concentration of 300×10^6 spermatozoa/mL proceeded to the cryopreservation process. Each ejaculate from the animals was divided into two distinct groups, where group A received the BotuBov[®] diluent medium (egg yolk - Botupharma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brazil) and group B received the commercial diluent medium based on liposomes (OptiXcell[®] 2 (1/3) and ultrapure water (2/3) - IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brazil). The semen was packaged in French straws, cooled to 5.0°C for 4 hours, placed in nitrogen vapor at -120.0°C for 20 minutes, and then submerged in liquid nitrogen at -196.0°C. Thawing of the straws was done at 37°C for 30 seconds, followed by computer-assisted sperm analysis (CASA - Hamilton Thorn Research – IVOS[®] 12, Beverly, Massachusetts, USA) previously adjusted for bovine seminal analysis. Data normality was tested using the Shapiro-Wilk test, means were compared using the T-test, and values were expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences ($P < 0.05$) were observed in the diluted semen samples from group A compared to group B regarding values of curvilinear velocity (VCL), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), linearity (LIN), and percentage of slow-moving spermatozoa (SLOW), respectively, where: 109 \pm 24.9 and 138.5 \pm 62.8 (VCL); 30.9 \pm 5.5 and 24.8 \pm 9.6 (BCF); 87.1 \pm 7 and 73.8 \pm 18.5 (STR); 57.8 \pm 10.3 and 46.1 \pm 13.3 (LIN); 5.6 \pm 6.1 and 7.7 \pm 6.7 (SLOW). No significant difference was observed for the values of total motility (TM), progressive motility (PM), average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), lateral head displacement amplitude (ALH), percentage of rapid spermatozoa (RAP), and percentage of medium-moving spermatozoa (MED), respectively, where: 16.4 \pm 17.3 and 14.7 \pm 13.7 (TM); 11.4 \pm 11.9 and 8.2 \pm 8.1 (PM); 66.2 \pm 14.8 and 75.3 \pm 31.1 (VAP); 57.9 \pm 12.7 and 56.9 \pm 21 (VSL); 4.5 \pm 1.4 and 5.3 \pm 2.8 (ALH); 12.4 \pm 12.7 and 11.8 \pm 11.2 (RAP); 4.1 \pm 6.7 and 3.1 \pm 3.0 (MED). After the three-hour thermoresistance test, significant differences ($P < 0.05$) were maintained only for linearity in the semen samples when diluted with the BotuBov[®] diluent medium and the liposome-based diluent. Even with data favoring the egg yolk-based diluent, semen samples containing liposome-based diluent may be a viable alternative for cryopreservation of buffalo semen collected by transrectal massage, serving as an alternative to the use of artificial vagina, which requires animal conditioning. It is concluded that in this study, the egg yolk-based diluent is superior to the diluent containing liposomes regarding the sperm kinetic parameters evaluated by CASA in bulls collected by massage of the accessory sex glands.

Keywords: sperm evaluation, buffalo, cryoprotectant, liposome