

Comparação da eficiência de criopreservação de sêmen de búfalos em períodos reprodutivos distintos

Jaci Almeida¹

¹Universidade Santa Úrsula – USU, Botafogo – RJ, Brasil
E-mail: jaciveterinariorj@gmail.com

A falta de sêmen congelado de búfalos no mercado nacional tem forçado os produtores e técnicos ao congelamento nas próprias propriedades onde se encontram os reprodutores. No entanto, devido à sazonalidade marcante da espécie em regiões de maiores latitudes, restrição dos métodos de coleta de sêmen e variabilidade da qualidade dos ejaculados, mesmo após o condicionamento dos reprodutores para a coleta com a vagina artificial, foi realizado um estudo com o objetivo de comparar os ejaculados de touros durante os períodos reprodutivo favorável (PRF) e desfavorável (PRD) em relação ao sucesso do congelamento. O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia em Bubalinocultura, sediado na Fazenda Experimental de Produção Sustentável da UFMG, em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, com altitude média de 710 metros, latitude 19°37'05" S e longitude 44°02'35" W, durante o PRF (maio a junho) e PRD (novembro e dezembro). Foram utilizados os mesmos 7 touros para os dois períodos avaliados, tendo os animais apresentado as seguintes características: idades 8,0±3,7 anos; peso 835,7±62,0 kg; ECC 3,6±0,5 e PE 36,1±2,0 da raça Murrah criados em sistema extensivo e com experiência sexual com fêmeas. Sendo todos os touros previamente submetidos à avaliação clínica e andrológica de acordo com CBRA (2013), posteriormente apresentados para uma fêmea em cio natural ou induzido, contida em tronco específico para coleta, nos turnos da manhã e tarde. As coletas foram realizadas com vagina artificial, com temperatura interna de 42 °C. A motilidade progressiva foi realizada pelo sistema CASA através do aparelho modelo Sperm Class Analyzer (SCA[®] v.4.0). Os valores médios e desvio padrão obtidos para os parâmetros seminais avaliados foram: volume (2,1±0,4 mL), turbilhonamento (2,1±0,4), vigor (3,4±0,5), motilidade (87,9±4,7%), concentração (1583,6±483,4x10⁶ spz/mL), defeitos maiores (6,0±0,9), normais (86,9±3,9%) e volume (1,5±0,5 mL), turbilhonamento (3,1±0,2), vigor (3,1±0,27), motilidade (82,9±4,7%), concentração (997,9±315,3x10⁶ spz/mL), defeitos maiores (6,0±1,4), normais (75,7±3,2%) para os PRF e PRD, respectivamente. Para o congelamento a campo utilizou-se uma caixa de poliestireno com as dimensões internas: 39,0x19,0x30,0 cm. O extensor comercial Botu-Bov[®] foi utilizado e as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, com concentração final de 40x10⁶ spz/mL. A análise estatística foi realizada com o software STATA 12.0. Foram obtidos os seguintes resultados (ejaculados congelados/ejaculados totais e respectivas taxas de criopreservação): para o PRF: 3/4 (75,5%), 1/3 (33,3%), 0/2 (0,0%), 2/4 (50,0%), 4/5 (80,0%), 1/2 (50,0%) e 1/2 (50,0%), totalizando 12/22 (54,5%); para o PRD: 5/11 (45,5%), 1/8 (12,5%), 4/6 (66,7%), 2/5 (40,0%), 1/7 (14,3%), 2/7 (28,6%) e 1/3 (33,3%), totalizando 16/47 (34,0%). A taxa de aproveitamento dos ejaculados foi significativamente superior na estação PRF em comparação à PRD (p = 0,048, teste exato de Fisher), indicando maior eficiência na criopreservação na estação PRF. Além disso, observa-se variabilidade individual na resposta ao congelamento entre os reprodutores, sugerindo influência de fatores individuais na taxa de criopreservação.

Palavras-chave: Criopreservação. Sazonalidade. Sêmen de búfalos.

Comparison of the efficiency of cryopreservation of buffalo semen in different reproductive periods

Jaci Almeida¹

¹Santa Úrsula University – USU, Botafogo – RJ, Brazil.
E-mail: jaciveterinariorj@gmail.com

The lack of frozen buffalo semen on the national market has forced producers and technicians to freeze semen on the properties where the bulls are located. However, due to the marked seasonality of the species in regions of higher latitudes, restrictions on semen collection methods, and variability in the quality of ejaculates, even after conditioning the bulls for collection with the artificial vagina, a study was conducted with the objective of comparing the ejaculates of bulls during the favorable reproductive periods (FRP) and unfavorable reproductive periods (URP) in relation to the success of freezing. The experiment was conducted at the Center for Biotechnology in Buffalo Breeding, located at the Experimental Farm for Sustainable Production of UFMG, in Pedro Leopoldo, Minas Gerais, with an average altitude of 710 meters, latitude 19°37'05" S and longitude 44°02'35" W, during the FRP (May to June) and URP (November and December). The same seven bulls were used for both periods evaluated, and the animals presented the following characteristics: age 8.0±3.7 years; weight 835.7±62.0 kg; BCS 3.6±0.5 and PE 36.1±2.0, all of the Murrah breed, raised in an extensive system and with sexual experience with females. All bulls were previously submitted to clinical and andrological evaluation according to CBRA (2013) and subsequently presented to a female in natural or induced estrus, contained in a specific trunk for collection, in the morning and afternoon shifts. Collections were performed with an artificial vagina, with an internal temperature of 42 °C. Progressive motility was performed by the CASA system using the Sperm Class Analyzer (SCA® v. 4.0) model. The mean values and standard deviation obtained for the evaluated seminal parameters were: volume (2.1±0.4 mL), turbulence (2.1±0.4), vigor (3.4±0.5), motility (87.9±4.7%), concentration (1583.6± 483.4x10⁶ spz/mL), major defects (6.0±0.9), normal (86.9±3.9%) and volume (1.5±0.5 mL), turbulence (3.1±0.2), vigor (3.1±0.27), motility (82.9±4.7%), concentration (997.9±315.3x10⁶ spz/mL), major defects (6.0±1.4), normal (75.7±3.2%) for FRP and URP, respectively. For field freezing, a polystyrene box with internal dimensions: 39.0x19.0x30.0 cm was used. The commercial Botu-Bov® extender was used and the samples were packaged in 0.5 mL straws, with a final concentration of 40x10⁶ spz/mL. Statistical analysis was performed using STATA 12.0 software. The following results were obtained (frozen ejaculates/total ejaculates and respective cryopreservation rates): for FRP: 3/4 (75.5%), 1/3 (33.3%), 0/2 (0.0%), 2/4 (50.0%), 4/5 (80.0%), 1/2 (50.0%) and 1/2 (50.0%), totaling 12/22 (54.5%); for URP: 5/11 (45.5%), 1/8 (12.5%), 4/6 (66.7%), 2/5 (40.0%), 1/7 (14.3%), 2/7 (28.6%) and 1/3 (33.3%), totaling 16/47 (34.0%). The ejaculate utilization rate was significantly higher in the FRP station compared to URP (p = 0.048, Fisher's exact test), indicating greater cryopreservation efficiency in the FRP station. In addition, individual variability in the response to freezing was observed among the bulls, suggesting the influence of individual factors on the cryopreservation rate.

Keywords: Cryopreservation. Seasonality. Buffalo semen.

Contaminação bacteriana no sêmen bovino congelado: Um obstáculo à eficácia da inseminação artificial

Sofia Regina Polizelle^{1*}; Ney Conti¹; Pedro Nacib Jorge-Neto²; Bianca de Mendonça Gondim¹; Luiz Gustavo Christovam de Matos¹; Gilson Antonio Pessoa³

¹Zebu Fértil, Campo Grande, Mato Grosso do Sul; ²Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo; ³Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Santa Maria, Rio Grande do Sul

*E-mail: spolizelle@gmail.com

A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) é uma biotecnologia reprodutiva amplamente utilizada nas fazendas. Antes da comercialização, o sêmen é coletado e processado em centrais especializadas que monitoram a qualidade do material, essencial para evitar danos às células espermáticas e garantir características adequadas para a fertilização. Contudo, esse material biológico pode conter bactérias oriundas da flora microbiana dos touros ou de contaminações ocorridas durante a coleta, processamento ou envase do ejaculado. A presença de micro-organismos nas doses de sêmen pode afetar tanto os espermatozoides quanto o trato reprodutivo das fêmeas. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da contaminação bacteriana preexistente em doses de sêmen bovino congelado sobre as taxas de prenhez. O estudo foi realizado em uma fazenda no Mato Grosso do Sul, envolvendo 1213 matrizes multíparas da raça Nelore, com escore médio de condição corporal (ECC) de $3,5 \pm 0,25$ (escala de 1-5), inseminadas com sêmen de três touros Aberdeen Angus (A, D e E) e dois touros Nelore (B e C). Foram utilizadas duas partidas de sêmen para cada touro, sendo previamente analisadas quanto à cinética utilizando o sistema IVOS-II (Hamilton Torne Inc.), consideradas aptas para comercialização dentro dos padrões mínimos aceitáveis. As partidas de sêmen também foram descongeladas e submetidas a cultura microbiológica em placas de ágar sangue para contagem (UFC) e identificação das bactérias, na qual uma apresentou contaminação natural (PC) (pelas bactérias *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas* sp) e outra não apresentou crescimento bacteriológico (PN). As matrizes seguiram um protocolo de sincronização que incluiu, no Dia 0, a aplicação de 2 mg de BE (IM) e um dispositivo intravaginal de 1 g (DIV). No Dia 8, o DIV foi removido e aplicada uma tinta na região sacral, junto com 1 mg de Cipionato de estradiol, 0,5 mg de Cloprostenol sódico (IM), e 300 UI de eCG (IM). A inseminação foi realizada no Dia 10 (48 horas após a remoção do DIV) e, nas vacas sem manifestação de estro, foi aplicado 0,01 mg de Acetato de Buserelina (IM). O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IA. Os dados foram analisados utilizando o SAS® OnDemand for Academics, procedimento Proc Glimmix, com comparações de médias pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%. Observou-se que as taxas de prenhez por touro e partidas foram: touro A com 37,4% (133/256; PC 35,7% e PN 39,4%), touro B com 44,9% (186/414; PC 41,8% e PN 49,4%), touro C com 61,4% (189/308; PC 56,9% e PN 69,1%), touro D com 41,7% (38/91; PC 31,1% e PN 63,3%), e touro E com 47,7% (21/44; PC 38,5% e PN 51,6%). Verificou-se uma maior taxa de prenhez nos touros B, C e E com as partidas não contaminadas, comparados aos touros A e D ($P=0,01$). As partidas não contaminadas tiveram uma taxa de prenhez/inseminação artificial (P/IA) de 51,6% (259/502), enquanto as partidas contaminadas mostraram 43,3% (308/711) ($P<0,0001$). A presença de *Pseudomonas* sp. impactou negativamente a taxa de prenhez (36,9%), em comparação com *Acinetobacter baumannii* (56,2%) e a ausência de contaminação (51,6%) ($P=0,0001$). No entanto, para o touro C, a contaminação por *Acinetobacter baumannii* resultou em menor prenhez (56,9%) em relação à partida não contaminada (69,1%). Conclui-se que a contaminação bacteriana do sêmen bovino congelado reduz as taxas de prenhez em vacas Nelore submetidas à IATF.

Palavras-chave: Sêmen bovino, IATF, microbiologia, controle de qualidade

Bacterial Contamination in Frozen Bovine Semen: An Obstacle to Artificial Insemination Efficacy

Sofia Regina Polizelle^{1*}; Ney Conti¹; Pedro Nacib Jorge-Neto²; Luiz Gustavo Christovam de Matos¹; Gilson Antonio Pessoa³

¹ Zebu Fértil, Campo Grande, Mato Grosso do Sul; ² Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, São Paulo; ³ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Santa Maria, Rio Grande do Sul

*E-mail: spolizelle@gmail.com

Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) is a widely used reproductive biotechnology in farms. Before market distribution, semen is collected and processed in specialized centers that monitor the quality of the material. This ensures that sperm cells remain undamaged and possess the necessary characteristics for successful fertilization. However, this biological material can harbor bacteria originating from the bull's microbial flora or from contamination during collection, processing, or packaging. The presence of microorganisms in semen doses can adversely affect both spermatozoa and the female reproductive tract. The aim of this study was to evaluate the impact of preexisting bacterial contamination in frozen bovine semen doses on pregnancy rates. The study was conducted on a farm in Mato Grosso do Sul, involving 1,213 multiparous Nelore cows with an average body condition score (BCS) of 3.5 ± 0.25 (scale 1-5). These cows were inseminated with semen from three Aberdeen Angus bulls (A, D, and E) and two Nelore bulls (B and C). Two batches of semen were used for each bull previously analyzed for motility using the IVOS-II system (Hamilton Thorne Inc.) and considered suitable for commercialization according to minimum acceptable standards. The semen batches were also thawed and subjected to microbiological culture on blood agar plates for colony-forming unit (CFU) counting and bacterial identification. One batch was classified as contaminated (CB), showing the presence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas* sp., while the other was classified as non-contaminated (UCB), with no bacterial growth detected. The cows followed a synchronization protocol, starting on Day 0 with the administration of 2 mg of BE (IM) and a 1 g intravaginal device (IVD). On Day 8, the IVD was removed, and a marker was applied to the sacral region, along with 1 mg of estradiol cypionate, 0.5 mg of sodium cloprostenol (IM), and 300 IU of eCG (IM). Insemination occurred on Day 10 (48 hours after IVD removal), and cows not showing estrus received 0.01 mg of Buserelin acetate (IM). Pregnancy diagnoses were carried out 30 days post-insemination. Data were analyzed using SAS® OnDemand for Academics with the Proc Glimmix procedure, and mean comparisons were performed using the Tukey test at a significance level of 5%. Pregnancy rates by bulls and batches were as follows: bull A achieved 37.4% (133/256; CB 35.7% and UCB 39.4%), bull B had 44.9% (186/414; CB 41.8% and UCB 49.4%), bull C reached 61.4% (189/308; CB 56.9% and UCB 69.1%), bull D obtained 41.7% (38/91; CB 31.1% and UCB 63.3%), and bull E recorded 47.7% (21/44; CB 38.5% and UCB 51.6%). Higher pregnancy rates were observed in bulls B, C, and E with uncontaminated batches compared to bulls A and D ($P=0.01$). Uncontaminated batches had a pregnancy per artificial insemination (P/AI) rate of 51.6% (259/502), while contaminated batches showed 43.3% (308/711) ($P<0.0001$). The presence of *Pseudomonas* sp. negatively affected the pregnancy rate (36.9%), compared to *Acinetobacter baumannii* (56.2%) and no contamination (51.6%) ($P=0.0001$). Nevertheless, for bull C, contamination with *Acinetobacter baumannii* resulted in lower pregnancy (56.9%) compared to the uncontaminated batch (69.1%). It is concluded that bacterial contamination of frozen bovine semen reduces pregnancy rates in Nelore cows subjected to FTAI.

Keywords: bovine sperm, FTAI, microbiology, quality control.

Influência do programa de inseminação artificial sobre a taxa de concepção e perda gestacional em novilhas leiteiras inseminadas com sêmen sexado

Andrey Osvaldo Souza Ferro^{1,2}, Fernando Eiras de Barros Pinto², Lucas Nascimento Stresser², Davi França Jorge³, Paulo de Tarso Lemos Borges³, Fábio Morotti²

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil;

²Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil; ³Policlínica Veterinária Pioneiros, Carambeí, Paraná, Brasil.

E-mail: andrey.ferro@unesp.br

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do programa de inseminação artificial (IA) convencional e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), empregando sêmen sexado, sobre a taxa de concepção e a perda gestacional em novilhas leiteiras. Foram utilizadas 382 novilhas Holstein, com idades entre 13 e 15 meses, peso corporal variando de 360 a 400 kg e escore de condição corporal (ECC) entre 2,75 e 4,00 ($3,2 \pm 0,4$, escala de 1 a 5), calendário regular de vacinação (CattleMaster®, Zoetis, Campinas, Brasil, e Bovi-Shield®, Zoetis), provenientes de uma única propriedade leiteira. Aos 13 meses, as novilhas foram avaliadas por ultrassonografia em modo B, utilizando o modelo Kaixim RKU10®, com frequência de 4,5 MHz e probe linear transretal, para monitorar a ciclicidade (presença do corpo lúteo). Com base nessa avaliação, as novilhas com presença de corpo lúteo, foram designadas para programa de IA ou IATF. O número médio de serviços por animal foi de $2,2 \pm 0,1$. As novilhas em cio natural ($n = 174$) foram identificadas por observação visual, utilizado a pintura na base da cauda como parâmetro auxiliar, e inseminadas 12 horas após a detecção do cio, utilizando sêmen sexado-X de três touros com fertilidade comprovada (4 milhões de espermatozoides por palheta). Para o grupo da IATF ($n = 209$), as novilhas receberam, no D0, a inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Zoetis) e benzoato de estradiol intramuscular (Gonadiol®, Zoetis). No D7, foi administrado dinoprost trometamina (PGF2 α ; Lutalyse®, Zoetis), e no D8, o dispositivo foi removido, com subsequente aplicação de cipionato de estradiol (E.C.P®, Zoetis) e nova dose de PGF2 α . A inseminação para o grupo da IATF foi realizada no D10, utilizando o mesmo sêmen dos touros do grupo de cio natural. Dois inseminadores realizaram as inseminações e o diagnóstico de gestação foi feito por ultrassonografia aos 30 e 60 dias. Os dados foram analisados por regressão logística binária, considerando como preditores categóricos o programa (IA convencional e IATF), o touro (A, B e C), o inseminador (I e II) e a ordem de serviço (1, 2 e 3), e como preditor contínuo o ECC. Os dados são apresentados em porcentagem (%), n/N , e todas as análises foram conduzidas no software Minitab® 22.1, com nível de significância de $P \leq 0,05$. A taxa de concepção foi influenciada pelo programa reprodutivo aos 30 dias ($P < 0,0001$; IA – 64,16% (111/173) vs. IATF – 40,19% (84/209)) e aos 60 dias ($P < 0,0001$; IA – 59,54% (103/173) vs. IATF – 37,80% (79/209)). O touro afetou a taxa de concepção aos 30 dias ($P = 0,05$), mas não aos 60 dias ($P = 0,15$). Não houve efeito significativo para ordem de serviço ($P = 0,66$ e $P = 0,43$), inseminador ($P = 0,51$ e $P = 0,38$) e ECC ($P = 0,78$ e $P = 0,88$) aos 30 e 60 dias, respectivamente. A perda gestacional foi similar entre os programas ($P = 0,92$) e não foi influenciada ($P > 0,1$) por nenhuma das fontes de variação analisadas. Além disso, não foram observadas interações significativas ($P > 0,1$) para a taxa de concepção ou para a perda gestacional. Nas condições do presente estudo, a escolha do programa de inseminação empregando semen sexado em novilha pode influenciar a taxa de concepção ao 30 e 60 dias, mas não a perda gestacional.

Palavras-chave: Sêmen sexado, taxa de concepção, perda gestacional, inseminação artificial, novilhas leiteiras.

Agradecimentos: Pioneiros.

The influence of the artificial insemination program on the conception rate and pregnancy loss in dairy heifers inseminated with sexed semen

Andrey Osvaldo Souza Ferro^{1,2}, Fernando Eiras de Barros Pinto², Lucas Nascimento Stresser², Davi França Jorge³, Paulo de Tarso Lemos Borges³, Fábio Morotti²

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil;

²Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil; ³Policlínica Veterinária Pioneiros, Carambei, Paraná, Brasil
e-mail: andrey.ferro@unesp.br

The objective of this study was to evaluate the influence of conventional artificial insemination (AI) and fixed-time artificial insemination (FTAI) programs using sexed semen on conception rates and pregnancy loss in dairy heifers. A total of 382 Holstein heifers were used, aged between 13 and 15 months, with body weights ranging from 360 to 400 kg and body condition scores (BCS) between 2.75 and 4.00 (3.2 ± 0.4 , on a 1 to 5 scale), all under a regular vaccination schedule (CattleMaster®, Zoetis, Campinas, Brazil, and Bovi-Shield®, Zoetis), and originating from a single dairy farm. At 13 months of age, the heifers were evaluated for cyclicity using B-mode ultrasonography (Kaixim RKU10®, 4.5 MHz linear transrectal probe) to detect the presence of a corpus luteum. Based on this assessment, heifers with a corpus luteum were assigned to either the AI or FTAI program. The average number of services per animal was 2.2 ± 0.1 . Heifers in natural estrus ($n = 174$) were identified by visual observation, using tailhead paint as an auxiliary indicator, and inseminated 12 hours after estrus detection with X-sexed semen from three proven-fertility bulls (4 million sperm per straw). In the FTAI group ($n = 209$), heifers received a progesterone intravaginal device (CIDR®, Zoetis) and an intramuscular injection of estradiol benzoate (Gonadiol®, Zoetis) on Day 0. On Day 7, they were administered dinoprost tromethamine (PGF2 α ; Lutalyse®, Zoetis), and on Day 8, the device was removed followed by an injection of estradiol cypionate (E.C.P®, Zoetis) and another dose of PGF2 α . Insemination for the FTAI group was performed on Day 10 using the same sexed semen from the bulls used in the natural estrus group. Two technicians carried out the inseminations, and pregnancy diagnosis was conducted by ultrasonography at 30 and 60 days post-insemination. Data were analyzed using binary logistic regression, with categorical predictors being the program (conventional AI and FTAI), the bull (A, B, and C), the technician (I and II), and service order (1st, 2nd, and 3rd), and BCS as a continuous predictor. Data are presented as percentages (%), n/N , and all analyses were performed using Minitab® 22.1 software, with a significance level of $P \leq 0.05$. Conception rate was influenced by the reproductive program at both 30 days ($P < 0.0001$; AI – 64.16% (111/173) vs. FTAI – 40.19% (84/209)) and 60 days ($P < 0.0001$; AI – 59.54% (103/173) vs. FTAI – 37.80% (79/209)). The bull had an effect on conception rate at 30 days ($P = 0.05$), but not at 60 days ($P = 0.15$). No significant effects were observed for service order ($P = 0.66$ and $P = 0.43$), technician ($P = 0.51$ and $P = 0.38$), or BCS ($P = 0.78$ and $P = 0.88$) at 30 and 60 days, respectively. Pregnancy loss was similar between the programs ($P = 0.92$) and was not influenced ($P > 0.1$) by any of the analyzed factors. Moreover, no significant interactions ($P > 0.1$) were observed for conception rate or pregnancy loss. Under the conditions of this study, the choice of insemination program using sexed semen in heifers may influence conception rate at 30 and 60 days, but not pregnancy loss.

Keywords: Sexed semen, conception rate, pregnancy loss, artificial insemination, dairy heifers.

Acknowledgments: Pioneiros.

Idade à puberdade e qualidade seminal de touros Nelore e Caracu criados a pasto.

Leticia Padovani da Silva¹, Marcelo Sant'Ana Borges¹, Marina de Oliveira Silva¹, Laura Fernanda Sechirolli da Silva¹, Pedro Luiz Bignardi¹, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante^{1,2}, Fabio Morato Monteiro^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), ²Instituto de Zootecnia

*E-mail: leticia.padovani@unesp.br

A identificação da puberdade em touros é essencial para a eficiência produtiva e o ganho genético, pois contribui para a redução do intervalo entre gerações. A idade à puberdade é influenciada por fatores ambientais, nutricionais e genéticos. Este estudo teve como objetivo avaliar a relação entre a idade à puberdade e a qualidade seminal de bovinos das raças *Bos indicus* (Nelore) e *Bos taurus* (Caracu) criados a pasto. Foram utilizados 44 touros jovens da raça Nelore (Ne) e 41 da raça Caracu (Ca), com idades iniciais de 13,9±0,8 e 14,1±0,6 meses e pesos de 369±41 e 381±33 kg, respectivamente. Seis avaliações foram realizadas a cada 60 dias, com coleta de sêmen por eletroejaculador, determinação da concentração espermática por fotômetro (SDM1, Minitub®, Berlin, Alemanha) e análise da cinética por meio do sistema de análise computadorizada do movimento espermático (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA). A puberdade foi definida como a presença de pelo menos de 50 x 10⁶ espermatozoides presentes no ejaculado e 10% de motilidade progressiva. Os resultados foram submetidos à análise de variância considerando medidas repetidas no tempo. A puberdade ocorreu aos 17,09±2,04 meses (407,91±57,18 kg) em animais Nelore e aos 16,28±2,90 meses (376,00±66,93 kg) em animais Caracu (P=0.30). Os parâmetros seminais não diferiram entre as raças Nelore e Caracu, respectivamente: concentração 106.82 ± 18.04 vs. 118.45 ± 18.04 (x10⁶/mL; P= 0.65), motilidade total (44.54 ± 3.55% vs. Ca= 44.32 ± 3.55%; P=0.96), motilidade progressiva (31.00 ± 3.20% vs. 32.01 ± 3.20%; P=0.81), RAP (43.64 ± 5.63% vs. 50.00 ± 5.63%; P=0.43), VAP (71.39 ± 3.84µm/s vs. 65.10 ± 3.84µm/s; P=0.25), VSL (60.98 ± 3.06µm/s vs. 54.04 ± 3.06 µm/s; P=0.12), VCL (117.05 ± 6.70µm/s vs. 107.80 ± 6.70mm/s; P=0.33), ALH (5.08 ± 0.28 µm vs. 4.94 ± 0.28 µm; P=0.73), BCF (35.29 ± 1.44Hz vs. 32.46 ± 1.44Hz; P=0.17), STR (79.95 ± 3.13% vs. 77.41 ± 3.13%; P=0.57), LIN (51.64 ± 2.66% vs. 44.45 ± 2.66%; P=0.06). A morfologia seminal também foi semelhante entre Nelore e Caracu, respectivamente: defeitos maiores (25.12 ± 3.47% vs. 25.98 ± 3.47%; P=0.86), defeitos menores (15.88 ± 2.49% vs. 17.69 ± 2.49%, P=0.61) e defeitos totais (41.00 ± 3.99% vs. 43.43 ± 3.99%; P=0.67). De modo geral, devido a diferenças genéticas e adaptativas, animais de raças *Bos indicus* tendem a atingir a capacidade reprodutiva mais tardiamente em comparação aos *Bos taurus*. No entanto, os resultados deste estudo sugerem que bovinos da raça Caracu (*Bos taurus*) apresentam idade à puberdade, peso e parâmetros seminais semelhantes aos observados em animais da raça Nelore (*Bos indicus*), o que reforça a adaptação dos taurinos Caracu às condições tropicais.

Palavras-chave: *Bos indicus* e *Bos taurus*, desenvolvimento sexual, eficiência reprodutiva.

Agradecimento: FAPESP (Process No. 2017/50339-5) and CAPES finance code 001.

Age at puberty and semen quality of Nellore and Caracu bulls raised on pasture.

Leticia Padovani da Silva¹, Marcelo Sant'Ana Borges¹, Marina de Oliveira Silva¹, Laura Fernanda Sechirolli da Silva¹, Pedro Luiz Bignardi¹, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante^{1,2}, Fabio Morato Monteiro^{1,2}

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), ²Instituto de Zootecnia.

*E-mail: leticia.padovani@unesp.br

Identifying puberty in bulls is essential for productive efficiency and genetic gain, as it helps to reduce the interval between generations. Age at puberty is influenced by environmental, nutritional and genetic factors. The aim of this study was to evaluate the relationship between age at puberty and seminal quality in *Bos indicus* (Nellore) and *Bos taurus* (Caracu) cattle raised at pasture. We used 44 young bulls of the Nellore breed (Ne) and 41 of the Caracu breed (Ca), with initial ages of 13.9±0.8 and 14.1±0.6 months and weights of 369±41 and 381±33 kg, respectively. Six evaluations were carried out every 60 days, with semen collected using an electroejaculator, sperm concentration determined using a photometer (SDM1, ®, Berlin, Germany) and kinetic analysis using a computerized sperm movement analysis system (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, USA). Puberty was defined as the presence of at least 50 x10⁶ spermatozoa in the ejaculate and 10% progressive motility. The results were submitted to analysis of variance considering repeated measures over time. Puberty occurred at 17.09±2.04 months (407.91±57.18 kg) in Nellore animals and at 16.28±2.90 months (376.00±66.93 kg) in Caracu animals ($P=0.30$). Seminal parameters did not differ between the Nellore and Caracu breeds, respectively: concentration 106.82 ± 18.04 vs. 118.45 ± 18.04 (x10⁶/mL; $P=0.65$), total motility (44.54 ± 3.55% vs. Ca= 44.32 ± 3.55%; $P=0.96$), progressive motility (31.00 ± 3.20% vs. 32.01 ± 3.20%; $P=0.81$), RAP (43.64 ± 5.63% vs. 50.00 ± 5.63%; $P=0.43$), VAP (71.39 ± 3.84µm/s vs. 65.10 ± 3.84µm/s; $P=0.25$), VSL (60.98 ± 3.06µm/s vs. 54.04 ± 3.06 µm/s; $P=0.12$), VCL (117.05 ± 6.70µm/s vs. 107.80 ± 6.70mm/s; $P=0.33$), ALH (5.08 ± 0.28 µm vs. 4.94 ± 0.28 µm; $P=0.73$), BCF (35.29 ± 1.44Hz vs. 32.46 ± 1.44Hz; $P=0.17$), STR (79.95 ± 3.13% vs. 77.41 ± 3.13%; $P=0.57$), LIN (51.64 ± 2.66% vs. 44.45 ± 2.66%; $P=0.06$). Seminal morphology was also similar between Nellore and Caracu, respectively: major defects (25.12 ± 3.47% vs. 25.98 ± 3.47%; $P=0.86$), minor defects (15.88 ± 2.49% vs. 17.69 ± 2.49%, $P=0.61$) and total defects (41.00 ± 3.99% vs. 43.43 ± 3.99%; $P=0.67$). In general, due to genetic and adaptive differences, *Bos indicus* animals tend to reach reproductive capacity later compared to *Bos taurus*. However, the results of this study suggest that cattle of the Caracu (*Bos taurus*) have an age at puberty, weight and seminal parameters similar to those observed in animals of the Nellore (*Bos indicus*), which reinforces the adaptation of Caracu taurines to tropical conditions.

Keywords: *Bos indicus* and *Bos taurus*, sexual development, reproductive efficiency.

Financial support: FAPESP (Process No. 2017/50339-5) and CAPES finance code 001.

Ecotextura testicular de touros jovens Nelore e Canchim sob diferentes condições microclimáticas

Joedson Dantas Gonçalves¹, Maria Emilia Franco Oliveira¹, Rubens Paes de Arruda², Gabriel Brun Vergani¹, Giovanna Galhardo Ramos², Alda Juliana Castro de Sousa³, Gabriela Novais Azevedo^{4,5}, Livia Ferreira Pinho³, Alexandre Rossetto Garcia^{3,5*}

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, 255, 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 FAPESP, Nível 3, São Carlos, SP, Brasil, ⁵Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil
E-mail: alexandre.garcia@embrapa.br

O ambiente de criação é crucial para o desenvolvimento sexual dos animais. Animais submetidos a um ambiente inadequado e a condições térmicas estressantes são mais suscetíveis a desenvolver alterações em suas funções testiculares. Nesse sentido, a ultrassonografia se lança como ferramenta para identificar possíveis alterações testiculares causadas pelo ambiente. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar as características ecogênicas testiculares de touros jovens das raças Nelore e Canchim, submetidos a diferentes condições microclimáticas em ambiente tropical. Foram usados 46 animais, sendo 22 Nelore (*Bos indicus*) e 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), com 8,0±0.1 meses de idade, 200,5±3.3 kg PV e escore de condição corporal 5,0 (escala de 1-9). Os animais foram mantidos em duas áreas experimentais, sendo: (1) Sistema Não-sombreado (NS), composto por 10 touros Nelore e 12 touros Canchim (NS Nelore e NS Canchim), alocados em pastagens com mínimo sombreamento natural, com área útil de sombra de 1,02%. (2) Sistema Silvopastoril (SSP), composto por 12 touros Nelore e 12 touros Canchim (SPS Nelore e SPS Canchim), mantidos em pastagens com eucaliptos (*Eucalyptus urograndis*, clone GG100) cultivados, com área útil de sombra de 30%. Ambos os sistemas de produção possuíam área de 12 ha para 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 12 meses (acompanhando os animais dos 8 aos 19 meses de idade), com equipamento Z60 Vet® (Mindray Bio-Medical Electronics Co, Shenzhen, China), com uso de transdutor linear multifrequencial de 5,0-8,0 MHz (52 mm; modelo 6LE5VP), com o equipamento ajustado em modo B, em frequência de 7,5 MHz. As imagens ultrassonográficas do parênquima testicular foram obtidas em cortes longitudinais, no terço médio do órgão. Foram selecionados três *frames* e analisados no software Image Pro Plus 7.0™ (Media Cybernetics, Inc., San Diego, CA, EUA) utilizando valores numéricos de pixels em escala de cinza variando de 0 (preto absoluto) a 255 (branco absoluto) para a obtenção da ecogenicidade (valor médio do pixel) e a heterogeneidade (desvio padrão do valor médio do pixel). Para todas as análises, foram extraídas médias das três mensurações realizadas. Foram realizadas avaliações de interações triplas entre tratamentos (NS e SPS), raças (Nelore x Canchim) e idade (8 a 19 meses). Os dados foram analisados pelo PROC MIXED com uma declaração repetida para avaliar a interação entre medidas sequenciais. As análises foram realizadas usando o software Statistical Analysis System (SAS), tendo sido adotado o nível de significância de 5% ($P < 0,05$). Houve interação significativa entre sistemas de produção, raças e idade para a ecogenicidade do parênquima ($P = 0,01$). Foi observado aumento progressivo da ecogenicidade do parênquima dos 8 meses em NS Canchim (45,54±6,18), SPS Canchim (35,63±6,11), NS Nelore (21,14±5,6,18) e SPS Nelore (24,79±5,83) até os 12 meses de idade em NS Canchim (95,57±5,59), SPS Canchim (81,72±6,11), NS Nelore (66,19±5,88) e SPS Nelore (47,46±5,47). Os grupos NS Canchim e SPS Canchim foram superiores aos grupos NS Nelore e SPS Nelore na maioria dos meses avaliados. Também houve interação tripla para a heterogeneidade do parênquima ($P < 0,0001$). A heterogeneidade do parênquima dos grupos NS Canchim e SPS Canchim foi superior à dos grupos NS Nelore e SPS Nelore dos 8 meses em NS Canchim (10,22±0,69), SPS Canchim (8,97±0,70), NS Nelore (5,82±0,69) e SPS Nelore (6,35±0,62) até 12 meses de idade em NS Canchim (15,11±0,62), SPS Canchim (14,48±0,63), NS Nelore (13,88±0,66) e SPS Nelore (10,52±0,61). No entanto, entre os 13 e 19 meses, os valores de heterogeneidade entre os grupos foram similares. Em conclusão, a ecogenicidade e heterogeneidade do parênquima testicular aumentam com a idade, obtendo pico máximo aos 12 meses. Além disso, as diferenças encontradas entre os tratamentos estão mais relacionadas ao fator racial, sendo que touros jovens da raça Canchim possuem valores ecogênicos superiores aos da raça Nelore. (Processos FAPESP 2021/04335-3 e CNPq 312295/2022-7).

Palavras-chave: Ultrassonografia; Andrologia Animal; Testículos; Bovinos.

Testicular echotexture of young Nelore and Canchim bulls under different microclimatic conditions

Joedson Dantas Gonçalves¹, Maria Emilia Franco Oliveira¹, Rubens Paes de Arruda², Gabriel Brun Vergani¹, Giovanna Galhardo Ramos², Alda Juliana Castro de Sousa³, Gabriela Novais Azevedo^{4,5}, Livia Ferreira Pinho³, Alexandre Rossetto Garcia^{3,5*}

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, 255, 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 FAPESP, Nível 3, São Carlos, SP, Brasil, ⁵Embrapa Pecuária Sudeste (CPPSE), Rod. Washington Luiz, km 234, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil
E-mail: alexandre.garcia@embrapa.br

The rearing environment is critical to the sexual development of animals. Animals exposed to an inadequate environment and thermal stress are more prone to develop changes in their testicular functions. In this sense, ultrasound is a tool to identify possible testicular changes caused by the environment. Therefore, the aim of this study was to evaluate the testicular echogenic characteristics of young bulls of the Nelore and Canchim breeds exposed to different microclimatic conditions in a tropical environment. A total of 46 animals were used, 22 Nelore (*Bos indicus*) and 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), aged 8.0±0.1 months, weighing 200.5±3.3 kg BW and with a body condition score of 5.0 (scale of 1-9). The animals were kept in two experimental areas: (1) Non-shaded system (NS), composed of 10 Nelore bulls and 12 Canchim bulls (NS Nelore and NS Canchim), distributed in pastures with minimum natural shade, with an available shade area of 1.02%. (2) Silvopastoral system (SPS), composed of 12 Nelore bulls and 12 Canchim bulls (SPS Nelore and SPS Canchim), located in pastures with cultivated eucalyptus (*Eucalyptus urograndis*, clone GG100), with an available shaded area of 30%. Both production systems had an area of 12 ha for intensive rotational grazing of *Urochloa brizantha* (cv Piatã), with *ad libitum* access to mineral mix and water. Ultrasound evaluations were performed once a month for 12 months (animals were monitored from 8 to 19 months of age) with a Z60 Vet® device (Mindray Bio-Medical Electronics Co, Shenzhen, China), using a 5.0-8.0 MHz multifrequency linear transducer (52 mm; model 6LE5VP), with the equipment set to mode B, at a frequency of 7.5 MHz. Ultrasound images of the testicular parenchyma were obtained in longitudinal sections in the middle third of the organ. Three frames were selected and analyzed in Image Pro Plus 7.0™ software (Media Cybernetics, Inc., San Diego, CA, USA) using numerical values of gray-scale pixels ranging from 0 (absolute black) to 255 (absolute white) to obtain echogenicity (mean pixel value) and heterogeneity (standard deviation of mean pixel value). For all analyses, averages were extracted from the three measurements performed. Evaluations of triple interactions between treatments (NS and SPS), breeds (Nelore x Canchim), and age (8 to 19 months) were performed. Data were analyzed using PROC MIXED with a repeated statement to evaluate the interaction between sequential measurements. Analyses were performed using Statistical Analysis System (SAS) software, and a significance level of 5% ($P < 0.05$) was used. There was a significant interaction between production systems, breeds and age for parenchyma echogenicity ($P = 0.01$). A progressive increase in parenchymal echogenicity was observed from 8 months of age in NS Canchim (45.54±6.18), SPS Canchim (35.63±6.11), NS Nelore (21.14±5.61) and SPS Nelore (24.79±5.83) up to 12 months of age in NS Canchim (95.57±5.59), SPS Canchim (81.72±6.11), NS Nelore (66.19±5.88) and SPS Nelore (47.46±5.47). The NS Canchim and SPS Canchim groups were superior to the NS Nelore and SPS Nelore groups in most of the months evaluated. There was also a three-way interaction for parenchymal heterogeneity ($P < 0.0001$). The parenchyma heterogeneity of the NS Canchim and SPS Canchim groups was higher than that of the NS Nelore and SPS Nelore groups at 8 months in NS Canchim (10.22 ± 0.69), SPS Canchim (8.97 ± 0.70), NS Nelore (5.82 ± 0.69) and SPS Nelore (6.35 ± 0.62) up to 12 months in NS Canchim (15.11 ± 0.62), SPS Canchim (14.48 ± 0.63), NS Nelore (13.88 ± 0.66) and SPS Nelore (10.52 ± 0.61). However, between 13 and 19 months, the heterogeneity values were similar between the groups. In conclusion, echogenicity and heterogeneity of the testicular parenchyma increase with age, reaching a maximum at 12 months. Furthermore, the differences observed between the treatments are more related to the racial factor, with young Canchim bulls having higher echogenic values than Nelore bulls. (Processes: FAPESP 2021/04335-3 and CNPq 312295/2022-7).

Keywords: Ultrasonography; Animal Andrology; Testicles; Cattle.

Análise comparativa da criopreservação de sêmen de touros Canchim jovens: avaliação de dois extensores comerciais na qualidade espermática pós-descongelamento

Mônica Machado Barbosa^{1*}, André Maciel Crespilho², Mariana Karla Francolino da Silva³, Jessica Moraes Malheiros¹, Marcelo Sant'Ana Borges⁴, Diorgenes Steve Soares de Lisboa¹, Fábio Morato Monteiro^{1,4}

¹Instituto de Zootecnia (IZ), Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, Sertãozinho, SP, Brasil; ²Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil; ³Departamento de reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP); Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" FCAV-Jaboticabal, SP, Brasil (UNESP)⁴.

*E-mail: monicajobanimal@gmail.com

A integridade da membrana plasmática é pré-requisito fundamental para a funcionalidade espermática, atuando como barreira protetora. Entretanto, em touros jovens, particularidades na composição lipídica desta membrana resultam em menor estabilidade estrutural, conferindo menor resistência e aumentando a susceptibilidade dos espermatozoides aos danos induzidos pelo processo de criopreservação. Nesse contexto, a composição do meio diluidor é determinante para a proteção da membrana. O diluidor a base de gema de ovo oferece capacidade crioprotetora superior, seus componentes essenciais, como lipoproteínas e fosfolípidios, interagem ativamente com a bicamada lipídica, promovendo sua estabilização. O potencial crioprotetor dos diluidores à base de lipossomas tem atraído crescente interesse na pesquisa, impulsionado justamente por sua composição definida, rica em lipídios e colesterol. Diante disso, este estudo teve como objetivo comparar amostras de sêmen criopreservado de animais jovens da raça Canchim, em função da cinética espermática após o descongelamento, utilizando os meios diluidores BotuBov® (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) e OptiXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, França). Foi utilizado sêmen de touros jovens da raça Canchim (n=31) com idade de 20-22 meses, pertencentes ao Centro Tecnológico da Central Bela Vista (Botucatu, SP). A coleta de sêmen foi realizada por eletroejaculação (Autojac, Neovet®, Uberaba, MG, Brasil). Foi utilizado um ejaculado por touro, sendo cada um dividido e diluído para formar dois grupos de tratamento: BotuBov® (BB) e OptiXcell® (OP). As amostras foram envasadas manualmente (8 palhetas de 0,5mL por tratamento por touro) (n=496). Após o envase, as palhetas foram refrigeradas a 5°C por 4 horas (Minitube®, Porto Alegre, RS, Brasil), equilibradas em vapor de nitrogênio a -120°C por 20 minutos e, posteriormente, imersas em nitrogênio líquido a -196°C. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliada quanto a cinética espermática através de análise computadorizada de sêmen (CASA – Hamilton Thorn Research IVOS® 12, Beverly, MA, USA), com parâmetros ajustados para sêmen bovino. A avaliação da cinética espermática compreendeu os seguintes parâmetros: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), percentual de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), frequência de batimento caudal (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). A análise estatística dos dados foi conduzida utilizando o software SAS (PROC GLM). A verificação da normalidade dos dados foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk. Em casos onde a normalidade foi confirmada, os dados foram submetidos à análise paramétrica. Para aqueles dados que não apresentaram distribuição normal, aplicou-se o teste não paramétrico NPARIWAY. A comparação das médias entre os grupos foi efetuada utilizando o teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%. Observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos BotuBov® (BB) e OptiXcell® (OP) em parte dos parâmetros cinéticos avaliados. Especificamente, o grupo OP apresentou valores médios superiores para velocidade média da trajetória (VAP), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e velocidade curvilínea (VCL). Por outro lado, o grupo BB mostrou maior retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Os valores detalhados foram: (VAP; BB: $66,1 \pm 9,1$ vs OP: $73,7 \pm 12,4$ µm/s; $p=0,007$), (ALH; BB: $5,9 \pm 1,0$ vs OP: $7,0 \pm 1,1$ µm; $p=0,0001$), (VCL; BB: $114,7 \pm 18,3$ vs OP: $134,2 \pm 23,3$ µm/s; $p=0,0011$), (STR; BB: $76,6 \pm 6,0$ vs OP: $70,3 \pm 5,7$ %; $p=0,0001$) e (LIN; BB: $47,6 \pm 6,5$ vs OP: $41,1 \pm 5,5$ %; $p=0,0001$). Para os demais parâmetros, não foi encontrada diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os grupos: motilidade total (MT; BB: $35,9 \pm 22,4$ vs OP: $31,1 \pm 14,8$ %; $p=0,494$), motilidade progressiva (MP; BB: $22,9 \pm 15,3$ vs OP: $17,4 \pm 8,2$ %; $p=0,162$), percentual de espermatozoides rápidos (RAP; BB: $27,4 \pm 17,6$ vs OP: $23,0 \pm 11,2$ %; $p=0,433$), velocidade em linha reta (VSL; BB: $51,2 \pm 7,6$ vs OP: $52,7 \pm 9,6$ µm/s; $p=0,557$) e frequência de batimento caudal (BCF; BB: $24,5 \pm 3,2$ vs OP: $25,1 \pm 4,2$ Hz; $p=0,557$). A utilização do BotuBov® na criopreservação de sêmen de touros jovens pode ser considerada uma alternativa viável para esta categoria animal. No entanto, estudos adicionais são necessários, especialmente aqueles que avaliem de forma mais detalhada a integridade da membrana plasmática e a fertilidade dos espermatozoides após o descongelamento.

Palavras-chave: andrologia, criopreservação de sêmen, diluidor, lipossomas, viabilidade espermática

Agradecimentos: A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela bolsa concedida. A empresa Botupharma – Botucatu, São Paulo, Brasil por ceder o diluidor para realização da pesquisa. A empresa Central Bela Vista - Botucatu, São Paulo Brasil, por ceder os animais e espaço para realização da pesquisa. Aos alunos do Instituto de Zootecnia por toda ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

Association between sexual precocity and Doppler velocimetric indices of the suprastesticular artery in Brangus young bulls

Celso Gabriel Ritz¹, Leonardo Oliveira Lopes¹, Higor Souza de Camargo¹, Deborah Nakayama Yokomizo¹, Gabriela Rodrigues de Paula¹, Marcelo Marcondes Seneda¹, Fábio Morotti^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR

*E-mail: fabiomorotti@uel.br

Doppler ultrasonography enables a more precise evaluation of testicular vascular hemodynamics and has therefore been widely used as a potential tool in reproductive assessment and the selection of young bulls. This study was based on the hypothesis that early maturing bulls, in addition to presenting differences in sperm parameters, also exhibit changes in Doppler velocimetric parameters of the suprastesticular artery. The objective of this study was to relate sexual precocity to sperm parameters and Doppler velocimetric indices of the suprastesticular artery in Brangus bulls. A total of 24 Brangus bulls, 15 months (m) old and with an average weight of 339 ± 38 kg, were evaluated at three different time points (15, 17, and 19 months of age, at 60-day intervals) for weight (kg), scrotal perimeter (SP, cm), semen production/semen analysis, and Doppler ultrasonography. Semen collections were performed by electroejaculation (Autojac[®], Neovet, Uberaba, Brazil), and semen analysis was carried out according to CBRA (2013) guidelines. For hemodynamic assessment, an ultrasound device (Sonoscape S8[®], Domed, Valinhos, Brazil) with a 7.5 MHz linear transducer was used. The transducer was positioned distally to the spermatic cord, and scanning was started in B-mode. Once the suprastesticular artery was identified, color Doppler mode was activated, followed by Pulsed-Wave (PW) Doppler to capture at least four cardiac cycles. The images were paused, and one of the cycles was manually traced to calculate average velocity (AV, cm/s), pulsatility index (PI), and resistive index (RI), which were recorded by the equipment. At the end of the study, data were grouped into two categories: early maturing ($n=12$, pubertal at 15 months) and late maturing bulls ($n=12$, non-pubertal at 15 months). Puberty was defined as the presence of an ejaculate with at least 50×10^6 spermatozoa and 10% motility. Data were analyzed by ANOVA using a generalized linear model (GLM). Sexual precocity was considered a fixed effect, and weight and SP were treated as covariates. Over time, GLM with repeated measures was used, considering the evaluation time as a fixed effect and animals as a random effect. Tukey's test was used for mean comparisons. Analyses were performed using Minitab[®] ($P<0.05$). Although both groups gained weight throughout the study ($P<0.001$), early maturing bulls (416 ± 5) had a higher final weight ($P=0.003$) compared to late maturing bulls (380 ± 8). At 15 months, early maturing bulls (31.58 ± 0.46) had greater SP ($P=0.04$) than late-maturing bulls (29.83 ± 0.73), but at 17 and 19 months, SP was similar ($P>0.1$) between groups. SP increased significantly over time in both groups ($P<0.0001$). Motility and vigor were higher in early maturing bulls at 15 months ($P<0.0001$) and at 17 months ($P<0.05$) but did not differ at 19 months ($P>0.05$). Kinetic parameters improved over time in late-maturing bulls ($P<0.05$) but remained constant in early maturing bulls ($P>0.1$). Sperm concentration/mL was higher in early maturing bulls at 15 months ($P<0.0001$) and did not differ at the other time points ($P>0.1$). Sperm concentration increased more markedly in early maturing bulls ($P=0.002$; 15m: 49.54 ± 10.46 vs. 19m: 353.86 ± 93.64) than in late-maturing bulls ($P=0.05$; 15m: 1.71 ± 0.94 vs. 19m: 102.20 ± 50.52). Only at 15 months did early maturing bulls show higher AV (17.39 ± 0.77 ; $P=0.032$), and lower PI (0.45 ± 0.03 ; $P=0.036$) and RI (0.49 ± 0.03 ; $P=0.06$; trend) compared to late-maturing bulls (14.75 ± 0.79 ; 0.61 ± 0.06 and 0.49 ± 0.03 , respectively). Doppler velocimetric parameters did not change in late-maturing bulls ($P>0.1$), but a reduction in AV was observed in early maturing bulls ($P=0.004$; 15m: 17.39 ± 0.77 vs. 19m: 13.22 ± 0.68). Doppler ultrasonography, combined with andrological evaluation, stands out as a promising tool for puberty assessment and may assist in the selection of early-maturing bulls.

Keywords: Bovine; Brangus; Doppler; Suprastesticular artery hemodynamics

Influência do diluente seminal na membrana espermática de sêmen bubalino colhido por massagem transretal associado ou não ao uso do eletroejaculador

Rogério Araújo de Almeida Filho¹; Luan Sitó da Silva¹; Luiz Gustavo Ferreira de Lima¹; Viviane Maria Codognoto¹; Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹; Eunice Oba^{1*}

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

Durante a criopreservação, há preocupação em certificar a qualidade do sêmen, levando em consideração aspectos morfológicos, danos a membrana espermática estão associados a queda de motilidade total e progressiva, porém, apesar da motilidade, espermatozoides danificados são menos propensos a fertilizar um oócito. O estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática e do acrossomo dos espermatozoides colhidos por massagem transretal das ampolas do ducto deferente associado ou não ao eletroejaculador após a criopreservação entre os diluentes com e sem gema de ovo. Foram utilizados dez búfalos da raça Murrah, com idade média de 5 anos, peso médio de 450kg e escore de condição corporal 4 (1-5). O sêmen foi colhido por massagem transretal das ampolas do ducto deferente (TRM), animais que não ejacularam na massagem seguiram pré-estimulados para colheita por eletroejaculador (TRM+EL). Foram colhidos 22 ejaculados totais 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 spz/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 e refrigerados à 5 °C por 4 horas, colocadas em vapor de nitrogênio -120 °C por 20 minutos e depois submergida em nitrogênio líquido à -196 °C. Para avaliação espermática por citometria de fluxo, uma amostra de sêmen foi descongelada em banho-maria a 37°C por pelo menos 30 segundos, utilizando o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EUA), foi realizada avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, avaliação da desestabilização da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, produção de superóxido e peroxidação lipídica. As amostras foram testadas quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk. Variáveis com distribuição normal foram representadas pela média e desvio padrão, e comparações entre médias foram feitas usando um teste t pareado para amostras independentes. Variáveis que não seguiram uma distribuição normal foram analisadas usando o teste de Wilcoxon. Variáveis relacionadas a comparação dos métodos de colheita seminal foram testadas quanto à normalidade e em seguida analisadas por ANOVA seguida do teste de Tukey. Quando comparado os dados de citometria de fluxo de ejaculados colhidos por TRM e TRM+EL de animais que ejacularam tanto na TRM quanto na TRM+EL e diferentes diluidores (EGY e LIP), não observamos diferença significativa quanto aos dados de membrana plasmática, membrana mitocondrial, peroxidação lipídica, geração de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, porém, comparando diretamente os diluentes durante a citometria de fluxo, o grupo EGY foi capaz de proteger melhor a membrana plasmática do espermatozoide do que o grupo LIP, apresentando um número significativamente ($P > 0,05$) menor de espermatozoides danificados, sendo que para membrana plasmática danificada e acrossomo intacto (MPLAI: $58,8 \pm 15,02$ vs, $48,8 \pm 18,9$); membrana plasmática intacta e acrossomo (MPAI: $29,7 \pm 13,1$ vs, $25,2 \pm 15,1$); membrana plasmática intacta e acrossomo danificado (MPAL: $8,8 \pm 7,3$ vs, $22,6 \pm 16,7$), para os parâmetros de membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (MPIAL) e o percentual de células com membrana estável (MS), não houve significância. Conclui-se que o diluente seminal, influenciou diretamente a membrana espermática do sêmen de bubalinos colhido por massagem transretal associado ou não ao uso do eletroejaculador.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, búfalo, crioprotetor, colheita seminal, eletroejaculação

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo CNPq, 302283/2022-6).

Influence of Semen Extender on the Sperm Membrane of Buffalo Semen Collected by Transrectal Massage with or without Electroejaculation

Rogério Araújo de Almeida Filho¹; Luan Sitó da Silva¹; Luiz Gustavo Ferreira de Lima¹; Viviane Maria Codognoto¹; Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹; Eunice Oba^{1*}

¹São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Botucatu/SP, Brazil

*E-mail: eunice.oba@unesp.br

During cryopreservation, there is a concern to ensure semen quality, taking into account morphological aspects. Damage to the sperm membrane is associated with a decrease in total and progressive motility; however, despite motility, damaged spermatozoa are less likely to fertilize an oocyte. The objective of this study was to evaluate the integrity of the plasma membrane and acrosome of spermatozoa collected by transrectal massage (TRM) of the ductus deferens ampullae with or without electroejaculation (EL) after cryopreservation, comparing extenders with and without egg yolk. Ten Murrah buffalo bulls were used, with a mean age of 5 years, mean weight of 450 kg, and body condition score of 4. Semen was collected by TRM of the ductus deferens ampullae; animals that did not ejaculate during massage were pre-stimulated for collection by electroejaculation (TRM+EL). A total of 22 ejaculates were collected between August 2023 and March 2024. After subjective evaluation, only ejaculates with total motility (TM) $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 , and a minimum concentration of 300×10^6 sperm/mL proceeded to cryopreservation. Each ejaculate was divided into two distinct groups: Group A received the BotuBov® extender (egg yolk-based – Botupharma Ltda, Botucatu, São Paulo, Brazil), and Group B received the commercial liposome-based extender (OptiXcell® 2 (1/3) + ultrapure water (2/3) – IMV Technologies, Campinas, São Paulo, Brazil). The semen was loaded into straws, refrigerated at 5°C for 4 hours, exposed to nitrogen vapor at -120°C for 20 minutes, and then submerged in liquid nitrogen at -196°C. For sperm evaluation by flow cytometry, a semen sample was thawed in a 37°C water bath for at least 30 seconds. Using the BD LSR Fortessa system (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), assessments were performed for plasma membrane and acrosomal integrity, plasma membrane destabilization, mitochondrial membrane potential, superoxide production, and lipid peroxidation. Data normality was tested using the Shapiro-Wilk test. Normally distributed variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation, and mean comparisons were made using a paired t-test for independent samples. Non-normally distributed variables were analyzed using the Wilcoxon test. Variables related to semen collection methods were tested for normality and then analyzed by ANOVA followed by Tukey's test. When comparing flow cytometry data from ejaculates collected by TRM and TRM+EL in animals that ejaculated in both methods, as well as different extenders (EGY and LIP), no significant differences were observed in plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, hydrogen peroxide generation, or superoxide anion levels. However, when directly comparing extenders during flow cytometry, the EGY group was able to better protect the sperm plasma membrane than the LIP group, presenting a significantly ($P > 0.05$) lower number of damaged sperm, for damaged plasma membrane/intact acrosome (MPLAI: 58.8 ± 15.02 vs. 48.8 ± 18.9), intact plasma membrane/intact acrosome (IPM/IA: 29.7 ± 13.1 vs. 25.2 ± 15.1), and intact plasma membrane/damaged acrosome (MPAI: 8.8 ± 7.3 vs. 22.6 ± 16.7) compared to the LIP group. No significant differences were found for intact plasma membrane/acrosomal damage (MPAL) or stable membrane (MS). In conclusion, the semen extender, particularly the egg yolk-based extender, directly influenced the quality of the spermatid membrane of the buffalo semen collected by transrectal massage with or without electroejaculation.

Keywords: Flow cytometry, buffalo, cryoprotectant, semen collection, electroejaculation

Acknowledgments: To Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 302283/2022-6).

Avaliação microbiológica de sêmen bovino criopreservado e eficiência na produção *in vitro* de embriões: resultados preliminares

Daniel Hikaru Jyoboji¹, Cassia Rejane Brito Leal², Andressa dos Santos Neves³, Nátili Freire Zanenga Chacha⁴, Gustavo Guerino Macedo², Eliane Vianna da Costa-e-Silva^{2*}

¹Graduação em Medicina Veterinária – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil; ²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande/MS,

³Médica Veterinária, Programa de Residência em Saúde em Medicina Veterinária, FAMEZ/UFMS ⁴Embriza Biotecnologias Ltda
Grupo de estudos e pesquisas em Reprodução Animal - GERA-MS/CNPq

*E-mail: eliane.silva@ufms.br

No cenário atual, a pecuária dispõe de métodos de biotecnologias da reprodução que, se implementadas adequadamente, permitem o maior desempenho quando comparada à monta natural. Embora cada vez mais utilizadas, as técnicas de reprodução assistida necessitam de cuidados sanitários, e nessa questão a contaminação do sêmen por microrganismos pode ter influência direta na qualidade dos espermatozoides. Assim, o presente trabalho tem como objetivo identificar a microbiota contaminante do sêmen bovino criopreservado e averiguar o impacto sobre a eficiência na Produção *in vitro* de embriões. Foram avaliadas 38 doses de 21 touros diferentes, oriundas de Centrais de coleta e processamento de sêmen (CCPS) ou criopreservadas a campo. Os resultados da Produção *in vitro* de embriões foram cedidos pela Embriza Biotecnologia de Embriões que seguiu seus protocolos comerciais de produção. As doses foram avaliadas quanto à qualidade seminal pós-descongelamento por métodos convencionais de acordo com a metodologia proposta no Manual do CBRA (2013) e por Análise Computadorizada do sêmen (CASA) utilizando o IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, EUA) com configuração previamente ajustada para análise de espermatozoides bovinos. Realizou-se cultura bacteriana em Ágar Batata e meio BHI, semeando as amostras de sêmen descongelado sob banho-maria e levados à incubadora a 36°C por até 72 horas. As amostras com crescimento bacteriano foram para meio específico de crescimento, identificou-se as bactérias e fez-se contagem de colônias que cresceram até 24 horas e antibiograma, testando-se para Penicilina, Enrofloxacin, Gentamicina, Ceftiofur e Estreptomicina. Comparou-se as variáveis dependentes taxa de produção de embriões viáveis (EMBv), número de embriões viáveis (nEMBv) e número de estruturas descartadas (DESC) por meio de análise de regressão, incluindo no modelo os efeitos de qualidade de sêmen subjetiva e as variáveis de cinética espermática avaliadas pelo CASA, além de efeitos de ocorrência de contaminação e tipos de contaminantes. As médias foram comparadas por teste de t ou Tukey de acordo com Origem (CCPS ou campo), estabelecimento (congeladas a campo e em Centrais 1,2,3) e Contaminação: Contaminantes (Livre, Fungos, *Pasteurella* e Bastonetes G-) ou de forma binomial (contaminada ou não). Das amostras analisadas foi possível confirmar o crescimento de fungos filamentosos (n=3) e bactérias (n=5). As unidades formadoras de colônias (UFC) presentes no ejaculado são um indicador das normas de higiene adotadas na coleta de sêmen. Do crescimento bacteriano identificou-se: *Micrococcus spp.* (>9900 UFC/mL), duas amostras com *Pasteurella sp.* (>100000 UFC/mL) e duas de *Stenotrophomonas maltophilia*. A contaminação ocorre mesmo sob as melhores condições de coleta, o sêmen *in natura* apresenta certa contaminação microbiana. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) até 2010 indicava os procedimentos higiênicos para as CCPS, e definia o limite de 5.000UFC/mL, mas atualmente, a OIE orienta quanto às boas práticas de higiene e tratamento de sêmen, com o objetivo de controlar a microbiota do trato reprodutivo masculino, mas não define o limite máximo aceitável de UFC/mL. Das três amostras que tiveram o crescimento de fungos filamentosos, duas apresentaram a taxa de produção de 23,8% e 25,6%, e uma amostra teve resultado satisfatório de 48% de produção de embriões. Já, nas amostras com crescimento de bactérias (n=5), quatro fertilizações apresentaram taxa de produção variando de 5% a 26,3%, sendo que em uma das FIVs houve crescimento bacteriano; e uma apresentou taxa de produção satisfatória de 49,3%. A análise de regressão chegou a modelos com coeficientes de regressão altos e modelos multivariados complexos para as variáveis dependentes: nEMBv, DESC e EMBv, considerando efeito das análises de qualidade seminal. A contaminação observada não afetou a produção de embriões. Quando comparamos a produção média de embriões em função da contaminação e origem do sêmen (congelado na fazenda ou nas centrais) não houve diferença significativa (P>0,05). Porém esse resultado pode ser influenciado pelo baixo número de doses analisadas. O antibiograma mostrou 100% de resistência a Penicilina, 33,3% à enrofloxacin, ceftiofur e estreptomicina, e 0% de resistência a gentamicina. Observada a resistência contra alguns dos antibióticos recomendados na I.N. 48/2003 (MAPA, 2003), há que se repensar a bateria de antibióticos permitidas na normativa e testar novas formulações para o controle de microrganismos no sêmen bovino.

Palavras chaves: Contaminação, microbiota, qualidade seminal, resistência a antibióticos, touros.

***Agradecimentos:** Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”, da Embriza Biotecnologia de Embriões e da Fazenda Arizona pela doação das doses para avaliação e liberação dos dados de produção de embriões.

Microbiological evaluation of cryopreserved bovine semen and efficiency in in vitro embryo production: preliminary results

Daniel Hikaru Jyoboji¹, Cassia Rejane Brito Leal², Andressa dos Santos Neves³, Nátili Freire Zanenga Chacha⁴, Gustavo Guerino Macedo², Eliane Vianna da Costa-e-Silva^{2*}

¹Graduação em Medicina Veterinária – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil; ²Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande/MS, ³Médica Veterinária, Programa de Residência em Saúde em Medicina Veterinária, FAMEZ/UFMS ⁴Embriza Biotecnologias Ltda

Grupo de estudos e pesquisas em Reprodução Animal - GERA-MS/CNPq

*E-mail: eliane.silva@ufms.br

In the current scenario, livestock farming has available methods of reproductive biotechnology that, if implemented properly, allow for greater performance when compared to natural mating. Although increasingly used, assisted reproduction techniques require sanitary care, and in this regard, semen contamination by microorganisms can have a direct influence on sperm quality. Thus, this study aims to identify the contaminating microbiota of cryopreserved bovine semen and to investigate its impact on the efficiency of in vitro embryo production. Thirty-eight doses of 21 different bulls, originating from semen collection and processing centers (CCPS) or cryopreserved in the field, were evaluated. The results of the in vitro production of embryos were provided by Embriza Biotechnology of Embryos, which followed its commercial production protocols. The doses were evaluated for post-thawing seminal quality by conventional methods according to the methodology proposed in the CBRA Manual (2013) and by Computerized Semen Analysis (CASA) using IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, USA) with a previously adjusted configuration for bovine sperm analysis. Bacterial culture was carried out in Potato Agar and BHI medium, seeding the thawed semen samples in a water bath and placed in an incubator at 36°C for up to 72 hours. The samples with bacterial growth were placed in a specific growth medium, the bacteria were identified and the colonies that grew up to 24 hours were counted. We did antibiogram and we tested the samples to Penicillin, Enrofloxacin, Gentamicin, Ceftiofur and Streptomycin. The dependent variables production rate of viable embryos (EMBv), number of viable embryos (nEMBv) and number of discarded structures (DESC) were compared using regression analysis, including in the model the effects of subjective semen quality and the sperm kinetics variables assessed by CASA, in addition to the effects of contamination occurrence and types of contaminants. The means were compared by t-test or Tukey according to Origin (CCPS or field), establishment (frozen in the field and in Centrals 1,2,3) and Contamination: Contaminants (Free, Fungi, Pasteurella and G- Rods) or binomial (contaminated or not). From the samples analyzed it was possible to confirm the growth of filamentous fungi (n=3) and bacteria (n=5). The colony forming units (CFU) present in the ejaculate are an indicator of the hygiene standards adopted in semen collection. From the bacterial growth, the following were identified: *Micrococcus* spp. (>9900 CFU/mL), two samples with *Pasteurella* sp. (>100000 CFU/mL) and two of *Stenotrophomonas maltophilia*. Contamination occurs even under the best collection conditions, fresh semen presents some microbial contamination. Until 2010, the World Organization for Animal Health (OIE) indicated hygienic procedures for CCPS, and defined the limit of 5,000CFU/mL, but currently, the OIE provides guidance on good hygiene and semen treatment practices, with the aim of controlling the microbiota of the male reproductive tract but does not define the maximum acceptable limit of CFU/mL. Of the three samples that had the growth of filamentous fungi, two showed a production rate of 23.8% and 25.6%, and one sample had a satisfactory result of 48% embryo production. In the samples with bacterial growth (n=5), four fertilizations showed production rates ranging from 5% to 26.3%, with one of the IVFs showing bacterial growth; and one had a satisfactory production rate of 49.3%. The regression analysis reached models with high regression coefficients and complex multivariate models for the dependent variables: nEMBv, DESC and EMBv, considering the effect of seminal quality analyses. The observed contamination did not affect embryo production. When we compared the average production of embryos depending on the contamination and origin of the semen (frozen on the farm or in the centers) there was no significant difference (P>0.05). However, this result may be influenced by the low number of doses analyzed. The antibiogram showed 100% resistance to Penicillin, 33.3% to enrofloxacin, ceftiofur and streptomycin, and 0% resistance to gentamicin. Resistance against some of the antibiotics recommended by the normative 48/2003 of Agriculture Department from Brazil (MAPA, 2003) was observed. We should test new antibiotics for diluents intended for semen cryopreservation and propose modifications to Brazilian regulations related to this topic.

Keywords: antibiotic resistance, bulls, contamination, microbiota, seminal quality.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001, Embriza Biotechnology of Embriões and Fazenda Arizona for donating the doses for evaluation and release of embryo production data.

Hidrocele em touro Nelore: Relato de caso.

**Talitha Rocha Ferraz^{1,5}, Claudia Novaes², Gustavo Roveda Stucchi³, Gustavo Guerino Macedo^{4,5},
Eliane Vianna da Costa-e-Silva^{4,5}**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil; ²Central Joia da Índia, Campo Grande, MS; ³Médico Veterinário, Fazenda Chaparral, Campo Grande, MS; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Grupo de estudos e pesquisas em Reprodução Animal - GERA-MS/CNPq

*E-mail: eliane.silva@ufms.br

Os touros reprodutores devem ser capazes de se mover com facilidade, detectar fêmeas no cio, realizar a monta, completar o serviço e fertilizar. Para isso, devem ser fisicamente saudáveis e passar por avaliações físicas que garantam a saúde física e sexual. A Hidrocele é uma condição em que ocorre um acúmulo anormal de fluidos entre as camadas visceral e parietal da túnica vaginal. Um touro da raça Nelore (seis anos de idade - 996kg), em regime de coleta de sêmen em Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), apresentou aumento de volume do testículo direito e patospermia após a coleta de sêmen por eletroejaculação, Motilidade=30%, vigor=3, 18%, 22% e 40% e 63% de Defeitos maiores (dMa), menores (dMe), totais (dTt) e porcentagem de células normais (%NORM), e somente 25% de células com membrana íntegra. Durante a anamnese, foi relatado uma laceração de óstio prepucial corrigida cirurgicamente, com retorno às atividades sexuais 30 dias depois. Após a entrada na CCPS, passou pela quarentena sem relato de nenhum incidente. Mas, sessenta dias depois relatou-se o aumento de volume testicular direito, sendo administrado Flunixin Meglumine (Banamine®) em dose única e repouso sexual. Porém, o animal não respondeu ao tratamento inicial e após 17 dias, foi realizado o exame andrológico pela equipe do Laboratório de Reprodução Animal. O touro apresentava visualmente uma distensão do escroto, temperatura de pele elevada, testículos A+++ , o esquerdo palpável e elástico e o direito com sensibilidade aumentada e presença de líquido. A curva sigmoide peniana apresentou-se palpável logo acima dos testículos, de forma muito evidente e protegida somente pela pele, projetando-se caudalmente e bastante móvel. Após a exposição peniana com eletroejaculação, a projeção da curva sigmoide suavizou e não demonstrava encarceramento ou aderências. O epidídimo apresentou cauda esquerda proeminente e palpável, enquanto a cauda direita estava difusa e pouco palpável. Na imagem ultrassonográfica, entre o testículo direito e o escroto, observou-se um espaço anecoico de 26,6mm e de 16,0mm entre na altura do cordão espermático. O diagnóstico, portanto, foi concluído como um quadro de hidrocele testicular com caracterização de degeneração moderada, com prognóstico moderado a desfavorável. Devido ao valor zootécnico do animal optou-se pelo tratamento: aplicação de Furosemida (Zalix®), 10mL, via IM a cada 24 horas, e imersão diária dos testículos e cordão espermático em gelo por sete dias. Além disso, a proteína total na dieta também foi diminuída para 10% durante 15 dias. Posteriormente, o animal foi acompanhado quanto à qualidade seminal, partida pós-descongelamento apresentou Motilidade=60%, Motilidade TTR= 20%, %Normais=74%, 50% de membranas íntegras, Análise no CASA: Motilidade total = 40.6%, Motilidade progressiva=16.8%, concentração de espermatozoides viáveis= 10.65x10⁶, velocidade média de percurso (VAP)= 84.00, velocidade em linha reta (VSL)=45.73. E 12 meses ele voltou a congelar partidas de sêmen em Central, congelando um total de 3.000 doses, expressando um resultado positivo do tratamento. Apesar da alta morfologia espermática anteriormente, o animal regrediu a patospermia e apresentou melhora significativa da qualidade espermática, sendo um dos poucos casos de tratamento com sucesso já documentados na literatura. Quadros de hidrocele em bovinos com características de degeneração testicular podem ser tratados com chances de sucesso, desde que feitos sob a orientação e supervisão adequada.

Palavras chaves: bovino, fisiopatologia, fertilidade, patologia do escroto.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”,

Hydrocele in a Nelore bull: Case report.

***Talitha Rocha Ferraz^{1,5}, Claudia Novaes², Gustavo Ferro³, Gustavo Guerino Macedo^{4,5},
Eliane Vianna da Costa-e-Silva^{4,5}**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – UFMS, Brazil; ²Central Joia da Índia, Campo Grande, MS; ³ Veterinary, Chaparral Farm, Campo Grande, MS; ⁴Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Grupo de estudos e pesquisas em Reprodução Animal - GERA-MS/CNPq

*E-mail: eliane.silva@ufms.br

Bulls must be able to move easily, detect females in heat, perform mounting, complete service and fertilize. To do this, they must be physically healthy and undergo physical evaluations that require physical and sexual health. Hydrocele is a condition in which an abnormal accumulation of fluid occurs between the visceral and parietal layers of the tunica vaginalis. A Nelore bull (six years old - 996kg), undergoing semen collection at the Semen Collection and Processing Center (CCPS), presented an increase in the volume of the right testicle (RT) and pathospermia after semen collection by electroejaculation, Motility = 30%, vigour = 3, 18%, 22% and 40% and 63% of major defects (Ma), minor defects (Mi), total defects (TT) and percentage of normal cells (%NORM), and only 25% of cells with intact membrane. During the anamnesis, a surgically corrected laceration of the preputial ostium was reported, with return to sexual activity 30 days later. At CCPS, your quarantine went without incident. However, sixty days later an edema appeared in the RT, and a single dose of Flunixin Meglumine (Banamine®) was administered, followed by sexual rest. However, the animal did not respond to the initial treatment and after 17 days, an andrological examination was performed by the Animal Reproduction Laboratory team. The bull visually presented a distended scrotum, high skin temperature, right testicular asymmetry, the left testicle was palpable and elastic and the RT with increased sensitivity and presence of fluid. The sigmoid curve of the penis was immediately palpable above the testicles, very evident and protected only by the skin, projecting caudally and quite mobile. After penile exposure with electroejaculation, the projection of the sigmoid curve softened and did not show incarceration or adhesions. The epididymis showed a prominent and palpable left tail, while the right tail was diffuse and barely palpable. In the ultrasound image, an anechoic space of 26.6 mm was observed between the RT and the scrotum, and a 16.0 mm space between the spermatic cord and the skin. The diagnosis, therefore, was concluded as a case of testicular hydrocele with characterization of moderate degeneration, with a moderate to unfavorable prognosis. Due to the zootechnical value of the animal, the treatment chosen was application of Furosemide (Zalix®), 10 mL, IM every 24 hours, and daily immersion of the testicles and spermatic cord in ice for seven days. In addition, the total protein in the diet was also reduced to 10% for 15 days. Subsequently, the animal was monitored for seminal quality, post-thawing batch presented Motility = 60%, TTR Motility = 20%, % Normal = 74%, 50% of intact membranes, CASA analysis: Total motility = 40.6%, Progressive motility = 16.8%, viable sperm concentration = 10.65x10⁶, average path velocity (VAP) = 84.00, straight line velocity (VSL) = 45.73. And 12 months later he returned to freezing batches of semen in Central, freezing a total of 3,000 doses, expressing a positive result of the treatment. Despite the high sperm morphology previously, the animal regressed pathospermia and presented significant improvement in sperm quality, being one of the few cases of successful treatment already documented in the literature. Hydroceles in cattle with characteristics of testicular degeneration can be treated with a high chance of success, as long as they are performed under proper guidance and supervision.

Keywords: bovine, fertility, pathophysiology, scrotal pathology.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”, Embriza Biotechnology of Embriões and Fazenda Arizona for donating the doses for evaluation and release of embryo production data.

Comparação entre tipos de sêmen, convencional vs. sexado, e métodos de separação espermática na produção *in vitro* de embriões bovinos

Marcio Gonçalves de Paula Junior¹, Thawan Santana Piemonte¹, Carlos Alonso Paco Nagaki¹, Larissa Araújo Stabile¹, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção^{1*}

¹Departamento de Reprodução Animal (VRA), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brasil
E-mail: meoaa@usp.br

Em 2024, o setor pecuário apresentou um crescimento de 1,6% no acumulado até setembro, contribuindo para mitigar os efeitos da retração geral do agronegócio. Para sustentar essa produtividade, torna-se essencial a otimização dos processos reprodutivos por meio de biotecnologias, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e a utilização de sêmen sexado. A PIVE é uma ferramenta essencial para o avanço reprodutivo e genético da pecuária, pois desempenha papel fundamental na aceleração do melhoramento genético e na maximização da eficiência reprodutiva, permitindo um aumento na produção de embriões com menor impacto ambiental. Neste contexto, a fertilização dos oócitos pode ser realizada tanto com sêmen convencional quanto com sêmen sexado. A sexagem espermática, geralmente conduzida por citometria de fluxo, possibilita a seleção da carga genética dos espermatozoides, porém há relatos de redução de fertilidade. Sempre com o objetivo de mimetizar processos fisiológicos, na etapa da fertilização *in vitro* (FIV) são empregados métodos de separação espermática. Os métodos mais utilizados são os gradientes descontinuos, como o Percoll® e o PureSperm®, ambos uma solução de sílica coloidal, que por meio de um gradiente e centrifugação, separam espermatozoides com melhor motilidade, sendo eficazes na remoção de células mortas e detritos celulares. A hipótese é de que o sêmen sexado apresenta menores taxas de produção *in vitro* de embriões em comparação ao sêmen convencional. Além disso, de que o sêmen convencional selecionado pelo meio de separação PureSperm® apresenta melhores taxas de desenvolvimento embrionário em comparação ao sêmen convencional separado pelo método Percoll®. Assim, o objetivo deste estudo é verificar se o sêmen sexado, de fato, resulta em menores taxas de produção *in vitro* de embriões em comparação ao sêmen convencional e se este, selecionado pelo PureSperm® apresenta taxas superiores de desenvolvimento embrionário em relação ao sêmen convencional selecionado por Percoll®. Para isso foi realizado uma análise retrospectiva de dados provenientes de quatro laboratórios comerciais de PIVE no Brasil. Como critério de inclusão, foram considerados dados de touros submetidos a, no mínimo, cinco manipulações de PIVE. Para a análise do tipo de sêmen (convencional ou sexado) foram incluídos dados de 364 touros Nelore. Na análise do método de separação (Percoll® ou PureSperm®) foram incluídos dados de sêmen convencional de 328 touros Nelore. Para cada touro, foram avaliadas as taxas de clivagem, de blastocistos e de desenvolvimento embrionário, determinado pela razão entre a taxa de blastocistos e a taxa de clivagem. A análise estatística foi conduzida no software R (versão 4.4.1) por meio do RStudio. Foram conduzidas duas análises, cada uma considerando uma variável categórica independente (tipo de sêmen: convencional ou sexado e método de separação: PureSperm® ou Percoll®) e três variáveis dependentes em comum (taxas de clivagem, de formação de blastocisto e de desenvolvimento embrionário). A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a comparação entre grupos foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney, adotando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para a rejeição da hipótese nula. O sêmen convencional apresentou maiores taxas de clivagem ($61,66 \pm 0,55\%$ vs. $55,30 \pm 1,57\%$; $p < 0.0001$), formação de blastocisto ($25,82 \pm 0,49\%$ vs. $20,53 \pm 1,38\%$; $p < 0.0001$) e desenvolvimento embrionário *in vitro* ($40,54 \pm 0,67\%$ vs. $35,04 \pm 1,86\%$; $p = 0,006$). O sêmen convencional processado com Percoll® não apresentou diferença significativa nas taxas de clivagem em comparação ao PureSperm® ($62,21 \pm 0,54\%$ vs. $60,19 \pm 1,34\%$; $p = 0,229$). No entanto, o processamento com o PureSperm® resultou em taxas significativamente maiores de formação de blastocisto ($33,48 \pm 1,08\%$ vs. $22,82 \pm 0,41\%$; $p < 0.0001$) e desenvolvimento embrionário ($52,83 \pm 1,25\%$ vs. $35,86 \pm 0,55\%$; $p < 0.0001$) *in vitro*, quando comparado ao Percoll®. Os resultados deste estudo confirmam a hipótese de que o sêmen convencional apresenta maior desempenho nas etapas da produção *in vitro* de embriões. No entanto, apesar da menor eficiência do sêmen sexado, sua utilização na PIVE continua sendo vantajosa, pois agrega valor econômico e genético ao sistema produtivo. Adicionalmente, verificou-se que o método de separação espermática exerce influência significativa sobre os desfechos embrionários. Embora o Percoll® não tenha apresentado diferença significativa nas taxas de clivagem, o PureSperm® demonstrou melhor desempenho nas fases posteriores, apresentando taxas superiores de formação de blastocistos e de desenvolvimento embrionário. Esse resultado sugere que o PureSperm®, além de motilidade, seleciona qualitativamente os espermatozoides, evidenciando que a escolha do meio de separação não deve ser apenas um detalhe técnico e econômico, mas uma decisão estratégica. Nesse contexto, a integração entre a PIVE, o uso planejado do sêmen sexado e a seleção adequada do método de separação espermática fortalece a aplicabilidade e a sustentabilidade dessa biotecnologia como ferramenta essencial para o avanço da pecuária moderna.

Palavras-chave: Bos Indicus, PIVE, Sexagem.

Agradecimentos: Às empresas Bio Reprodução Animal, CPEX Embriões, Fertiliza Consultoria, Norte Embryo pela parceria e confiança no fornecimento dos dados.

Comparison between conventional and sexed semen, and sperm separation methods for *in vitro* embryo production in bovine

Marcio Gonçalves de Paula Junior¹, Thawan Santana Piemonte¹, Carlos Alonso Paco Nagaki¹, Larissa Araújo Stabile¹, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção^{1*}

¹Department of Animal Reproduction (VRA), School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo, Brazil
E-mail: meoaa@usp.br

In 2024, the livestock sector showed a 1.6% growth up to September, helping to mitigate the overall decline in agribusiness. To sustain this productivity, it becomes essential to optimize reproductive processes through biotechnologies such as *in vitro* embryo production (IVP) and sexed semen. IVP is a key tool for reproductive and genetic advancement in livestock, as it plays a fundamental role in accelerating genetic improvement and maximizing reproductive efficiency, enabling increased embryo production with lower environmental impact. In this biotechnology, oocyte fertilization can be performed using conventional or sexed semen. Sperm sexing, generally conducted by flow cytometry, enables the selection of sex-specific genetic content of spermatozoa, with reports of reduced fertility. To replicate physiological processes, sperm separation methods are employed during the *in vitro* fertilization (IVF) step. The colloidal silica-based solutions Percoll® and PureSperm® form a discontinuous density gradient, which, by centrifugation, separates sperm with better motility and effectively removes dead cells and cellular debris. We hypothesized that sexed semen results in lower *in vitro* embryo production rates than conventional semen. Additionally, conventional semen selected by the PureSperm® method yields better embryonic development rates. Therefore, this study aims to verify whether sexed semen results in lower *in vitro* embryo production rates than conventional semen and whether conventional semen selected by PureSperm® presents higher embryonic development rates than conventional semen separated by Percoll®. The present study proposes a retrospective analysis of data from four commercial IVP laboratories in Brazil. As an inclusion criterion, only data from bulls subjected to at least five IVP procedures were considered. For the semen type analysis (conventional or sexed), data from 364 Nellore bulls were included. For the sperm separation method analysis (Percoll® or PureSperm®), conventional semen data from 328 Nellore bulls were used. For each bull, cleavage, blastocyst, and embryonic development rates were evaluated, the latter being defined as the ratio between blastocyst and cleavage rate. Statistical analysis was conducted using R software (version 4.4.1) via RStudio. Two separate analyses were performed, each considering one independent categorical variable (semen type: conventional or sexed, and separation method: PureSperm® or Percoll®) and three commonly dependent variables (cleavage rate, blastocyst rate, and embryonic development rate). Data distribution was assessed using the Shapiro–Wilk test, and group comparisons were performed using the Mann–Whitney U test, with a 5% significance level ($p < 0.05$) for rejecting the null hypothesis. Conventional semen showed higher cleavage rates ($61.66 \pm 0.55\%$ vs. $55.30 \pm 1.57\%$; $p < 0.0001$), blastocyst formation rates ($25.82 \pm 0.49\%$ vs. $20.53 \pm 1.38\%$; $p < 0.0001$), and *in vitro* embryonic development rates ($40.54 \pm 0.67\%$ vs. $35.04 \pm 1.86\%$; $p = 0.006$). Conventional semen processed with Percoll® showed no significant difference in cleavage rates compared to PureSperm® ($62.21 \pm 0.54\%$ vs. $60.19 \pm 1.34\%$; $p = 0.229$). However, semen processed with PureSperm® resulted in significantly higher blastocyst formation ($33.48 \pm 1.08\%$ vs. $22.82 \pm 0.41\%$; $p < 0.0001$) and embryonic development rates ($52.83 \pm 1.25\%$ vs. $35.86 \pm 0.55\%$; $p < 0.0001$) compared to Percoll®. These results confirm that conventional semen performs better in *in vitro* embryo production stages. Despite the lower efficiency of sexed semen, its use in IVP remains advantageous due to its economic and genetic value to the production system. Additionally, the sperm separation method significantly influenced embryonic outcomes. Although Percoll® did not differ in cleavage rate, PureSperm® had a better performance in later stages, with higher blastocyst formation and embryonic development rates. This suggests that, beyond motility, PureSperm® also selects spermatozoa with higher quality, indicating that the choice of separation medium should not be seen as a mere technical or economic detail, but rather a strategic decision. In this context, the integration of IVP, the planned use of sexed semen, and the appropriate selection of sperm separation methods enhance the applicability and sustainability of this biotechnology as a key tool for the advancement of modern livestock production.

Keywords: Bos indicus, IVP, Sexing.

Acknowledgments: Bio Reprodução Animal, CPEX Embriões, Fertiliza Consultoria, and Norte Embryo, for providing the data.

Efeito da gonadotrofina coriônica humana na maturidade sexual em touros da raça Nelore

Teresinha Inês de Assumpção¹, Thamiris Pinheiro Melo², Neimar Correa Severo³,
Renata Lançoni¹, Leonardo Teixeira⁴

¹Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFU, ²ABS Global, Uberaba/MG,

³Doutorando PPGCVET-UFU, Uberlândia, MG, ⁴Sincroniza Gerenciamento Pecuário, Uberaba/MG

E-mail: teassumpcao@ufu.br

A maturidade sexual precoce impacta positivamente a rentabilidade dos rebanhos, reduzindo custos e aumentando a eficiência reprodutiva. Os andrógenos desempenham um papel importante no desenvolvimento sexual e na fisiologia reprodutiva dos machos. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) tem uma ação semelhante ao hormônio luteinizante, estimulando a produção de testosterona nos testículos e contribuindo para o processo de espermatogênese. Este estudo teve como objetivo investigar o efeito da hCG na maturidade sexual de touros da raça Nelore, visando antecipar a entrada na reprodução. Vinte touros da raça Nelore com idades entre 14 e 16 meses foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (controle) e Grupo 2 (tratados com 2500 UI de hCG intramuscular a cada 7 dias durante 28 dias). Todos os animais passaram por avaliações clínicas, incluindo aferições de peso e circunferência escrotal, além da coleta de sêmen e sangue. O sêmen foi coletado por eletroejaculação e foram realizadas análises de suas características físicas e morfológicas e também feita a avaliação da concentração sérica de testosterona. O soro sanguíneo foi obtido após centrifugação do sangue a 1500g/10 minutos e então congelado a -20°C até as análises que foram realizadas pela técnica de quimioluminescência com kits Roche®, em aparelho Elecsys (sensibilidade do teste = 3 ng/dL) e foram procedidas no laboratório TECSA® em Belo Horizonte/MG. A coleta de sangue para a dosagem de testosterona foi realizada nos mesmos animais no primeiro e último dia de pesquisa. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey para comparação entre grupos, além do teste T pareado para análise de testosterona comparando os animais tratados com hCG e não tratados. Os resultados não indicaram diferenças significativas entre os animais tratados e o grupo controle quanto ao perímetro escrotal, morfologia espermática (defeitos totais, maiores e menores) e concentração espermática, porém os animais tratados apresentaram valores de motilidade e vigor espermático menores em comparação com os animais do grupo controle. A média de testosterona (ng/dL) em soro sanguíneo de touros tratados com hCG foi de 1086,13 ($\pm 145,21$) e naqueles não tratados de 1031,5 ($\pm 120,89$), sendo $P=0,77$, não havendo assim diferença estatística entre os dois grupos, esta dosagem foi feita no final da pesquisa. Portanto, a utilização de hCG em machos da raça Nelore de 14 a 16 meses não demonstrou eficácia nas características do sêmen e na produção de testosterona, não interferindo assim na antecipação da maturidade sexual dos animais.

Palavras-chave: reprodução, bovinos, hormônios, sêmen.

Effect of human chorionic gonadotropin on sexual maturity in Nellore bulls

Teresinha Inês de Assumpção¹, Thamiris Pinheiro Melo², Neimar Correa Severo³,
Renata Lançoni¹, Leonardo Teixeira⁴

¹ Animal Reproduction Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Uberlândia,
²ABS Global, Uberaba/MG, ³ PhD student PPGCVET-UFU, Uberlândia/MG, ⁴ Synchronizes Livestock Management, Uberaba/MG
E-mail: teassumpcao@ufu.br

Early sexual maturity positively impacts herd profitability by reducing costs and enhancing reproductive efficiency. Androgens play a critical role in sexual development and the reproductive physiology of males. Human chorionic gonadotropin (hCG) has a luteinizing hormone-like action, stimulating testosterone production in the testes and contributing to spermatogenesis. This study aimed to investigate the effect of hCG on the sexual maturity of Nellore bulls, with the goal of accelerating reproductive readiness. Twenty Nellore bulls aged 14 to 16 months were divided into two groups: Group 1 (control) and Group 2 (treated with 2500 IU of intramuscular hCG every 7 days for 28 days). All animals underwent clinical evaluations, including weight and scrotal circumference measurements, semen collection, and blood sampling. Semen was collected via electroejaculation and analyzed for physical and morphological characteristics, while serum testosterone concentration was assessed. Blood serum was obtained after centrifugation at $1500 \times g$ for 10 minutes and frozen at -20°C until analysis. Testosterone levels were measured using Roche® chemiluminescence kits on an Elecsys analyzer (test sensitivity = 3 ng/dL) at the TECSA® laboratory in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Blood collection for testosterone quantification occurred on the first and final days of the study. Data were analyzed using the Tukey test for group comparisons and a paired T-test for testosterone levels between hCG-treated and untreated animals. Results showed no significant differences between treated and control groups in scrotal circumference, sperm morphology (total, major, and minor defects), or sperm concentration. However, treated animals exhibited lower sperm motility and vigor compared to controls. The mean serum testosterone (ng/dL) in hCG-treated bulls was $1086.13 (\pm 145.21)$, versus $1031.5 (\pm 120.89)$ in untreated bulls ($P=0.77$), with no statistical difference between groups at the study's conclusion. Thus, hCG administration in 14- to 16-month-old Nellore bulls did not improve semen characteristics or testosterone production, failing to accelerate sexual maturity in these animals.

Keywords: reproduction, cattle, hormones, semen.

Relação entre ecogenicidade testicular e qualidade do sêmen de touros Nelore

Beatriz Silva Carriel¹; Elisa Marcondes²; Gabriel Rafael Raul Monar¹; Matheus Henrique Vargas de Oliveira³; André Maciel Crespilho^{2,3*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

²Curso de Medicina Veterinária, Universidade Santo Amaro, São Paulo, Brasil

³Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo, Brasil

*E-mail: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

A qualidade espermática representa uma das características mais importantes a ser considerada nos sistemas de produção de bovinos, o que ressalta a relevância do exame andrológico no contexto da avaliação reprodutiva de touros. Dentre as diferentes técnicas associadas e complementares ao exame andrológico, a avaliação ultrassonográfica é considerada por diversos autores como ferramenta indispensável à avaliação reprodutiva de machos bovinos. Este trabalho tem como objetivo correlacionar a intensidade de pixels formadores de imagens ultrassonográficas de testículos de touros jovens (TJ) da raça Nelore, com diferentes parâmetros de qualidade empregados para avaliação do sêmen bovino, testando-se a hipótese de que parênquimas testiculares mais ecogênicos e homogêneos encontram-se associados a animais com maior qualidade seminal e, potencialmente, mais férteis. Foram analisadas imagens ultrassonográficas testiculares provenientes de 158 touros com idade média de 18 meses ao início do confinamento (total de 316 imagens, considerando testículo direito e esquerdo de cada animal) utilizando software computacional IMAGEJ (<https://imagej.net/ij/>). O número de pixels formadores das imagens ultrassonográficas foi contabilizado considerando 6 pontos do parênquima testicular avaliados em plano longitudinal (3 pontos tomados dorsalmente ao mediastino testicular e 3 ventrais) a partir de probe ultrassonográfica linear, em frequência auto-ajustável entre 6,1 a 8,0 MHz (Sonoscape E2Vet, China). Todos os animais foram submetidos a confinamento em baia coletiva (média de 40 animais por baia) por período de 72 dias, recebendo 22 kg de ração total 2 vezes ao dia durante o período de estabulação. Os exames ultrassonográficos reprodutivos, bem como exame andrológico completo (incluindo coleta e avaliação de sêmen), foram realizados no dia da entrada no confinamento (D0) e após 60 dias (D60). Os dados gerados foram analisados através de modelo de regressão linear misto a partir do software STATSMODEL 3.3 (Python Software Foundation, Wilmington, DE, EUA) através da função MixedLM. Diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$. Motilidade total, progressiva e vigor espermático, que representam os principais parâmetros cinéticos considerados na avaliação inicial de qualidade do sêmen bovino apresentaram baixa correlação com o número médio de pixels formadores das imagens ultrassonográficas testiculares ($r < 0,2$; $P > 0,1$), tanto na avaliação no D0 quanto no D60. Baixas correlações ($P < 0,05$) também foram verificadas para a associação entre o percentual de defeitos espermáticos totais com a ecogenicidade testicular no D0 ($r = -0,5$) e D60 ($r = -0,12$). No entanto, a concentração espermática no D0 ($r = 0,659$; $P < 0,0001$) e percentual de defeitos menores em D0 ($r = -0,787$; $P < 0,0001$) foram significativamente associados ao número médio de pixels formadores das imagens ultrassonográficas testiculares. Redução significativa no percentual de defeitos maiores ($P < 0,001$), menores ($P = 0,0019$) e totais ($P = 0,0065$) foi observado quando comparados os momentos D0 e D60. De acordo com a metodologia e condições experimentais desse trabalho, é possível concluir que TJ da raça Nelore e com maior ecogenicidade testicular produzem ejaculados mais concentrados e com menor proporção de defeitos espermáticos menores, confirmando a hipótese inicial do estudo. De acordo com os resultados da pesquisa é possível estabelecer que o exame ultrassonográfico testicular possui ampla aplicação prática, permitindo a identificação de touros com maior potencial reprodutivo e maior qualidade espermática, fatores que podem impactar positivamente nos resultados produtivos de uma fazenda.

Palavras-chave: Ecogenicidade, exame andrológico, maturidade sexual, touro, ultrassonografia.

Relationship between testicular echogenicity and semen quality in Nelore bulls

Beatriz Silva Carriel¹; Elisa Marcondes²; Gabriel Rafael Raul Monar; Matheus Henrique Vargas de Oliveira²; André Maciel Crespilho^{2,3*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

²Curso de Medicina Veterinária, Universidade Santo Amaro, São Paulo, Brasil

³Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo, Brasil

*E-mail: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

Sperm quality is one of the most important characteristics to be considered in cattle production systems, which highlights the importance of the andrological examination in the context of reproductive evaluation of bulls. Among the different techniques associated with and complementary to the andrological examination, ultrasound evaluation is considered by several authors to be an indispensable tool in the reproductive evaluation of bovine males. The aim of this study was to correlate the intensity of pixels forming ultrasound images of the testicles of young bulls with different quality parameters used to evaluate bovine semen, testing the hypothesis that more echogenic and homogeneous testicular parenchyma is associated with more seminal quality and, potentially, more fertile animals. Testicular ultrasound images from 158 bulls with an average age of 18 months at the start of confinement were analyzed (a total of 316 images, considering the right and left testicle of each animal) using IMAGEJ computer software (<https://imagej.net/ij/>). The number of pixels forming the ultrasound images was calculated using 6 points of the testicular parenchyma assessed in the longitudinal plane (3 points taken dorsally to the testicular mediastinum and 3 ventrally) using a linear ultrasound probe with a self-adjusting frequency of between 6.1 and 8.0 MHz (Sonoscape E2Vet, China). All the animals were confined in a collective stall (an average of 40 animals per stall) for a period of 72 days, receiving 22 kg of total feed twice a day during the lairage period. Reproductive ultrasound examinations, as well as a complete andrological examination (including semen collection and evaluation), were carried out on the day they entered the feedlot (D0) and after 60 days (D60). The data generated was analyzed using a mixed linear regression model using the STATSMODEL 3.3 software (Python Software Foundation, Wilmington, DE, USA) using the MixedLM function. Differences were considered when $P < 0.05$. Total motility, progressive motility and sperm vigor, which represent the main kinetic parameters considered in the initial quality assessment of bovine semen, showed a low correlation with the average number of pixels forming the testicular ultrasound images ($r < 0.2$; $P > 0.1$), both in the D0 and D60 evaluations. Low correlations ($P < 0.05$) were also found for the association between the percentage of total sperm defects and testicular echogenicity at D0 ($r = -0.5$) and D60 ($r = -0.12$). However, sperm concentration at D0 ($r = 0.659$; $P < 0.0001$) and percentage of minor defects at D0 ($r = -0.787$; $P < 0.0001$) were significantly associated with the average number of pixels forming the testicular ultrasound images. A significant reduction in the percentage of major ($P < 0.001$), minor ($P = 0.0019$) and total ($P = 0.0065$) defects was observed when comparing D0 and D60. According to the methodology and experimental conditions of this study, it is possible to conclude that Nelore breed JWs with greater testicular echogenicity produce more concentrated ejaculates with a lower proportion of minor sperm defects, confirming the initial hypothesis of the study. According to the results of the study, it can be established that ultrasound testicular examination has a wide practical application, allowing the identification of bulls with greater reproductive potential and higher sperm quality, factors that can have a positive impact on a farm's production results.

Keywords: Echogenicity, andrological examination, sexual maturity, bull, ultrasound.

Comparações de diferentes técnicas de avaliação da concentração espermática em touros

Lara Pieshko¹, Larissa Nunes Oliveira¹, Amanda Nonato², Ana Clara Faquinel Cavalcante Mendes de Ávila², Adolfo Firmo Ferreira², Vitória Caroline Abdalla de Mendonça Siqueira¹, Renata Lanconi^{1*}

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

²Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

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

O objetivo desse estudo foi realizar a contagem de espermatozoides bovinos e comprovar a exatidão dos métodos *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) e Espectrofotômetro em definir a concentração espermática, em comparação com o *NucleoCounter*® (NC), considerado “padrão-ouro” na técnica. O NC possui custo elevado e, por essa razão, motiva estudos para encontrar outros meios também de alta acurácia. Sendo assim, trezentas amostras de sêmen de touros em regime frequente de coleta em Central de Coleta e Processamento de Sêmen foram analisadas no laboratório. Os ejaculados eram recebidos e encaminhados ao CASA Systems IVOS® II (IMV Technologies Brasil) para determinação da concentração. Posteriormente, para as análises do NC, utilizou-se um auto diluidor com fator de diluição 4000:10 e um reagente para tratar as células espermáticas. Após homogeneização em agitador de tubos, a amostra foi adicionada ao *Cassette*™ e este inserido no *NucleoCounter*® SP-100™ *Sperm Cell Counter* (Chemometec) para contagem automática dos DNAs espermáticos. Por fim, a última porção de cada amostra foi novamente homogeneizada, diluída na concentração de 35:3500, adicionada a uma cubeta vedada por filme plástico de parafina e lida pelo Espectrofotômetro SDM 6 (Minitube). Os dados foram avaliados comparativamente (sempre mantendo o NC como padrão, ou seja, NC x Espectrofotômetro e NC x CASA) pelo teste de correlação de Pearson, onde houve correlações lineares significativas entre os métodos, sendo 0,79 entre o NC e o Espectrofotômetro e, 0,76 entre o NC e o CASA, porém estas foram consideradas de moderada magnitude. No teste T houve diferença estatística significativa quando feita a comparação entre NC e outros tratamentos, apresentando médias ($\pm$ E.P.M) de 650,97 ($\pm$ 12,87) no NC, 508,86 ($\pm$ 12,85) no Espectrofotômetro e 489,37 ($\pm$ 11,33) no CASA. No teste F de variâncias, o NC e o Espectrofotômetro mostraram-se iguais ($P=0,98$), enquanto o NC e o CASA diferiram ($P=0,02$). Apesar de diferentes estatisticamente (provavelmente devido a grande quantidade de dados analisados) o valor numérico foi pequeno (1,28). Por fim, no teste de regressão entre NC e Espectrofotômetro foi visto que $R^2 = 0,62$ e, entre NC e CASA, $R^2 = 0,59$, assim, a relação é linear. Portanto, conclui-se com esse estudo que os métodos *NucleoCounter*®, *Computer Assisted Sperm Analysis* e Espectrofotômetro apresentam resultados diferentes quanto à concentração espermática, apesar de serem mínimas as variações entre eles, permanecendo o primeiro como o mais acurado.

Palavras-chave: sêmen; bovino; concentração; espermatozoides; métodos de contagem.

Comparisons of different techniques for assessing sperm concentration in bulls

Lara Pieshko¹, Larissa Nunes Oliveira¹, Amanda Nonato², Ana Clara Faquinel Cavalcante Mendes de Ávila², Adolfo Firmo Ferreira², Vitória Caroline Abdalla de Mendonça Siqueira¹, Renata Lanconi^{1*}

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

²Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

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

The objective of this study was to perform bovine sperm counting and verify the accuracy of the Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) and Spectrophotometer methods in determining sperm concentration, in comparison to the NucleoCounter® (NC), considered the “gold standard” technique. The NC has a high cost, which motivates studies to find other methods that are also highly accurate. Thus, three hundred semen samples from bulls under a frequent collection regime at a Semen Collection and Processing Center were analyzed in the laboratory. The ejaculates were received and sent to the CASA Systems IVOS® II (IMV Technologies Brazil) for concentration determination. Subsequently, for NC analyses, an autodiluter with a 4000:10 dilution factor and a reagent to treat the sperm cells were used. After homogenization in a tube shaker, the sample was added to the Cassette™ and inserted into the NucleoCounter® SP-100™ Sperm Cell Counter (Chemometec) for automatic DNA sperm counting. Finally, the last portion of each sample was again homogenized, diluted at a concentration of 35:3500, added to a cuvet sealed by paraffin plastic film, and read by the SDM 6 Spectrophotometer (Minitube). The data were evaluated comparatively (always using the NC as the standard, that is, NC vs. Spectrophotometer and NC vs. CASA) using Pearson's correlation test, where significant linear correlations were observed between the methods: 0.79 between the NC and the Spectrophotometer, and 0.76 between the NC and CASA, however, these correlations were considered of moderate magnitude. In the T test, there was a statistically significant difference when comparing NC with other treatments, with means ($\pm$ S.E.M) of 650.97 ($\pm$ 12,87) on the NC 508,86 ($\pm$ 12,85) on Spectrophotometer and 489,37 ($\pm$ 11,33) on the CASA. In the F test for variances, NC and Spectrophotometer were statistically equal ($P=0.98$), while NC and CASA were statistically different ($P=0.02$). Although statistically different (likely due to the large amount of data analyzed), the numerical difference was small (1.28). Finally, in the regression test between NC and Spectrophotometer, $R^2 = 0.62$ was observed, and between NC and CASA, $R^2 = 0.59$, indicating a linear relationship. Therefore, this study concludes that the NucleoCounter®, Computer Assisted Sperm Analysis and Spectrophotometer methods present different results regarding sperm concentration, although the variations between them are minimal, with the first remaining the most accurate.

Keywords: semen; bovine; concentration; sperm cells; counting methods.

Comparação dos parâmetros vasculares do plexo pampiniforme durante a puberdade entre touros jovens Nelore e Caracu

¹Pedro Luiz Bignardi, ¹Marcelo Sant'Ana Borges, ¹Leticia Padovani da Silva, ¹Marina de Oliveira Silva, ¹Laura Fernanda Sechioroli da Silva, ²Victor Guidi Zardo, ¹Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, ¹Fabio Morato Monteiro

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Androvet – Sertãozinho, São Paulo, Brasil

A puberdade em machos representa um marco fisiológico fundamental, definido pelo início da produção de espermatozoides viáveis e móveis. Esse processo pode ser influenciado por fatores genéticos, ambientais e fisiológicos. A compreensão das alterações vasculares testiculares durante essa fase é essencial para a avaliação do desenvolvimento de mecanismos relacionados à termorregulação testicular ao longo da maturação reprodutiva. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo comparar os parâmetros vasculares obtidos por ultrassonografia Doppler do plexo pampiniforme durante as diferentes fases da puberdade entre touros jovens das raças Nelore e Caracu. Foram utilizados 44 touros jovens da raça Nelore (Ne) e 41 touros jovens da raça Caracu (Ca), com idade inicial média de $13,9 \pm 0,8$ e $14,1 \pm 0,6$ meses e peso inicial de 369 ± 41 e 381 ± 33 kg, respectivamente. Os animais foram avaliados em seis momentos, com intervalo de 60 dias entre as avaliações. Em cada avaliação, foi realizada ultrassonografia modo Doppler na região do cone vascular, utilizando um aparelho Mindray Z5 acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz. Imediatamente após o exame ultrassonográfico, foi realizada a coleta de sêmen por meio de eletroejaculador (Autojac, Neovet). Foi observado diferença entre os grupos quanto à idade de entrada na puberdade, sendo necessário estabelecer a equidade das fases com base nesse parâmetro. Assim, o momento em que cada animal atingiu a puberdade foi considerado como o momento zero. A puberdade foi definida quando o primeiro ejaculado apresentava o mínimo de 50×10^6 espermatozoides e mínimo de 10% de espermatozoides móveis; e maturidade sexual foi definida quando o primeiro ejaculado apresentava o mínimo de 70% de espermatozoides morfolologicamente normais e aos menos 50% de espermatozoides móveis. Os grupos foram separados como pré-púbere (período anterior ao atingir a puberdade), púbere (período ao atingir a puberdade e antes de atingir a maturidade sexual) e pós púbere (período após atingir a maturidade sexual). Os resultados foram submetidos à análise de variância considerando medidas repetidas no tempo (SAS®). Foi observada diferença no diâmetro da artéria testicular entre as raças nos períodos pré-púbere (Ne = $0,21 \pm 0,006$ cm vs. Ca = $0,25 \pm 0,01$ cm; $P = 0,01$) e púbere (Ne = $0,23 \pm 0,005$ cm vs. Ca = $0,26 \pm 0,009$ cm; $P = 0,006$). No entanto, essa diferença não foi observada no período pós-púbere (Ne = $0,29 \pm 0,01$ cm vs. Ca = $0,29 \pm 0,02$ cm; $P = 0,94$). Não foram observadas diferenças entre as raças no diferentes períodos de puberdade nos demais parâmetros avaliados, sendo: velocidades do pico sistólico (Ne = $12,87 \pm 0,41$ cm/s vs. Ca = $13,88$; $P = 0,24$) e final diastólica (Ne = $7,36 \pm 0,36$ cm/s vs. Ca = $7,57 \pm 0,68$ cm/s; $P = 0,78$); índices de pulsatilidade (Ne = $0,63 \pm 0,04$ vs. Ca = $0,72 \pm 0,08$; $P = 0,37$) e de resistência vascular (Ne = $0,44 \pm 0,02$ vs. Ca = $0,47 \pm 0,04$; $P = 0,51$). As diferenças observadas no diâmetro da artéria testicular entre as raças avaliadas podem estar associadas a particularidades morfofisiológicas inerentes ao grupo racial. Considerando que bovinos taurinos tendem a apresentar maior volume testicular e maior desenvolvimento escrotal em comparação a zebrinos, é possível que essas características estejam relacionadas a um maior aporte vascular, refletindo em maior diâmetro arterial. A ausência de variações nos parâmetros hemodinâmicos sugere que a diferença anatômica observada no presente estudo não interferiu no fluxo sanguíneo testicular. Foi concluído que touros jovens da raça Caracu apresentam maior diâmetro da artéria testicular nos períodos pré-púbere e púbere em comparação aos touros jovens da raça Nelore, o que pode refletir diferenças morfofisiológicas entre as raças. No entanto, essas variações anatômicas não resultam em alterações nos parâmetros hemodinâmicos avaliados por Doppler, sugerindo que o maior diâmetro arterial não comprometeu a perfusão testicular. Esses achados indicam que, embora haja diferenças morfológicas vasculares entre raças zebrina e taurina, elas não necessariamente implicam em alterações funcionais durante a puberdade.

Palavras-chave: Doppler, Ultrassonografia, Puberdade.

Comparison of vascular parameters of the pampiniform plexus during puberty between young Nelore and Caracu bulls

¹Pedro Luiz Bignardi, ¹Marcelo Sant'Ana Borges, ¹Leticia Padovani da Silva, ¹Marina de Oliveira Silva, ¹Laura Fernanda Sechiroli da Silva, ²Victor Guidi Zardo, ¹Maria Eugênia Zerlotti Mercadante, ¹Fabio Morato Monteiro

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) – Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Androvet – Sertãozinho, São Paulo, Brasil

Puberty in males represents a key physiological milestone, defined by the onset of viable and motile sperm production. This process can be influenced by genetic, environmental, and physiological factors. Understanding testicular vascular changes during this phase is essential for assessing the development of thermoregulatory mechanisms throughout reproductive maturation. Therefore, the present study aimed to compare vascular parameters obtained via Doppler ultrasonography of the pampiniform plexus during different stages of puberty in young Nelore and Caracu bulls. A total of 44 young Nelore (Ne) bulls and 41 young Caracu (Ca) bulls were used, with an initial average age of 13.9 ± 0.8 and 14.1 ± 0.6 months and an initial weight of 369 ± 41 and 381 ± 33 kg, respectively. The animals were evaluated at six time points, with 60-day intervals between assessments. At each evaluation, Doppler-mode ultrasonography was performed on the vascular cone region using a Mindray Z5 device with a 7.5 MHz linear transducer. Immediately after the ultrasound, semen collection was performed using an electroejaculator (Autojac, Neovet). Differences were observed between groups in the age of puberty onset, requiring the standardization of puberty stages based on this parameter. Thus, the time at which each animal reached puberty was considered time zero. Puberty was defined when the first ejaculate contained at least 50×10^6 spermatozoa with a minimum of 10% motility. Sexual maturity was defined when the first ejaculate presented at least 70% morphologically normal sperm and at least 50% motile sperm. Animals were classified as prepubertal (prior to puberty onset), pubertal (between puberty onset and sexual maturity), and postpubertal (after reaching sexual maturity). Data were analyzed by repeated measures ANOVA (SAS®). Differences in testicular artery diameter were observed between breeds during the prepubertal (Ne = 0.21 ± 0.006 cm vs. Ca = 0.25 ± 0.01 cm; $P = 0.01$) and pubertal (Ne = 0.23 ± 0.005 cm vs. Ca = 0.26 ± 0.009 cm; $P = 0.006$) stages. However, this difference was not observed in the postpubertal period (Ne = 0.29 ± 0.01 cm vs. Ca = 0.29 ± 0.02 cm; $P = 0.94$). No differences were found between breeds across puberty stages for the other vascular parameters evaluated, including peak systolic velocity (Ne = 12.87 ± 0.41 cm/s vs. Ca = 13.88 cm/s; $P = 0.24$), end-diastolic velocity (Ne = 7.36 ± 0.36 cm/s vs. Ca = 7.57 ± 0.68 cm/s; $P = 0.78$), pulsatility index (Ne = 0.63 ± 0.04 vs. Ca = 0.72 ± 0.08 ; $P = 0.37$), and vascular resistance index (Ne = 0.44 ± 0.02 vs. Ca = 0.47 ± 0.04 ; $P = 0.51$). The observed differences in testicular artery diameter between the evaluated breeds may be associated with breed-specific morphophysiological characteristics. Considering that taurine cattle tend to exhibit greater testicular volume and scrotal development compared to zebu breeds, these traits may be linked to increased vascular supply, reflected in larger arterial diameter. The lack of variation in hemodynamic parameters suggests that the anatomical difference observed did not affect testicular blood flow. It was concluded that young Caracu bulls exhibit a greater testicular artery diameter during prepubertal and pubertal stages compared to young Nelore bulls, which may reflect morphophysiological differences between the breeds. However, these anatomical variations did not result in changes in hemodynamic parameters assessed by Doppler, suggesting that the larger arterial diameter did not compromise testicular perfusion. These findings indicate that although there are vascular morphological differences between taurine and zebu breeds, they do not necessarily imply functional alterations during puberty.

Keywords: Doppler, Ultrasonography, Puberty

Efeitos da programação fetal por meio do desmame antecipado e convencional na progênie subsequente de machos da raça Nelore, provenientes de fêmeas primíparas e múltiparas, sobre o peso e a puberdade

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Guilherme Pugliesi², Isabella Rio Feltrin², Alexandre Rossetto Garcia³, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁴, Paulo Roberto Leme⁵, Arlindo Saran Netto⁵, Rodrigo Silva Goulart⁵, Germán Darío Ramirez Zamudio⁵, Thiago Kan Nishimura², Jheovana Spegiorin Pinheiro da Silva¹.

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; ³Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil; ⁴Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPaR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo - USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ⁵Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brasil
*E-mail: arrudarp@usp.br

Fatores que afetam a saúde e o desempenho da mãe gestante podem ter efeitos a longo prazo na prole, decorrentes de estímulos ou lesões durante períodos críticos da gestação os quais modulam o desenvolvimento fetal e interferem no desempenho da progênie, conceito o qual é denominado de programação fetal. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da programação fetal por meio do desmame antecipado e convencional sobre o peso e a entrada à puberdade da prole subsequente de machos, gerada por fêmeas primíparas ou múltiparas. Durante todo o experimento, as fêmeas permaneceram em pastagens de *Brachiaria spp.* e receberam suplementação proteica na oferta de 1g/kg de peso corporal por animal por dia (41,05 e 31,65% de proteína bruta e 47,32 e 72,62% de nutriente digestível total, durante a estação chuvosa e seca, respectivamente). Foram avaliados 56 machos da raça Nelore. Durante o desenvolvimento fetal destes animais, suas mães, primíparas ou múltiparas, desmamaram bezerras com 150 ou 240 dias (desmame antecipado ou convencional, respectivamente). Desta forma, dos 56 animais que foram utilizados, 29 foram provenientes de fêmeas primíparas, sendo 14 do grupo desmame antecipado e 15 do desmame convencional. Os outros 27 animais foram gerados por fêmeas múltiparas, sendo 13 pertencentes ao grupo desmame antecipado e 14 do desmame convencional. O peso (kg) e as colheitas de sêmen aconteceram aos 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, utilizando uma balança digital e a técnica de eletroejaculação, respectivamente. Os animais foram classificados como púberes ao apresentarem no mínimo 10% de motilidade subjetiva e 50 milhões de espermatozoides no ejaculado. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SAS (Versão 9.2; SAS Institute), utilizando o teste de ANOVA aplicando 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. Para peso os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão e para puberdade foram calculadas as porcentagens de cada subpopulação na amostra. Foram analisados os efeitos de mãe, desmame, idade e interação entre eles e considerados como diferença significativa quando $P \leq 0,05$. Para peso, houve efeito para categoria de mãe ($p=0,01$), sendo os dados expressos como média $\pm$ erro padrão: 332,8^a $\pm$ 5,2 e 311,0^b $\pm$ 4,6 kg nos machos provenientes de múltiparas e primíparas, respectivamente. Além disso, houve também efeito de idade ($p < 0,01$): 267,9^d $\pm$ 4,0, 304,1^c $\pm$ 4,2, 334,7^b $\pm$ 4,4 e 381,4^a $\pm$ 4,7 kg quando avaliados em 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, respectivamente. Para puberdade não houve efeito de categoria de mãe, tipo de desmame ou interações ($p > 0,05$), porém houve efeito de idade ($p < 0,01$), acumulando o percentual de 7,2^b, 28,7^b, 48,2^{ab} e 71,2^{ao}% quando os animais foram avaliados em 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, respectivamente. Como já era esperado, os resultados do presente estudo demonstram que os animais adquiriram mais peso ao passar dos meses. Além disso, a prole de vacas múltiparas foi beneficiada quando analisado o peso desses animais. Entretanto, apesar do peso ser comumente associado com a entrada dos animais à puberdade, por indicar os animais mais adaptados às condições ambientais em que vivem, os quais são previstos apresentarem espermatogênese mais desenvolvida, os animais provenientes de múltiparas não se tornaram púberes mais precocemente. Os dados de puberdade evidenciam que realizar desmame de forma antecipada ou convencional em ambas as classes de mães, não propiciou efeito de programação fetal na prole subsequente de machos da raça Nelore.

Palavras-Chave: Bovinos, Nelore, Puberdade.

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

Effects of fetal programming through early and conventional weaning on subsequent progeny of Nelore males from primiparous and multiparous females on weight and puberty

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Guilherme Pugliesi², Isabella Rio Feltrin², Alexandre Rossetto Garcia³, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁴, Paulo Roberto Leme⁵, Arlindo Saran Netto⁵, Rodrigo Silva Goulart⁵, Germán Darío Ramirez Zamudio⁵, Thiago Kan Nishimura², Jheovana Spegiorin Pinheiro da Silva¹.

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; ³Animal Reproduction Laboratory, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brazil; ⁴Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ⁵Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brazil
*E-mail: arrudarp@usp.br

Factors that affect the health and performance of the pregnant mother may have long-term effects on the offspring, resulting from stimuli or injuries during critical periods of gestation that modulate fetal development and interfere with the performance of the progeny, a concept called fetal programming. The objective of the present study was to evaluate the effects of fetal programming through early and conventional weaning on the weight and onset of puberty of subsequent male offspring sired by primiparous or multiparous females. Throughout the experiment, the females remained on *Brachiaria* spp. pastures and received protein supplementation at the rate of 1 g/kg of body weight per animal per day (41.05 and 31.65% of crude protein and 47.32 and 72.62% of total digestible nutrient, during the rainy and dry seasons, respectively). Fifty-six Nelore males were evaluated. 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 the conventional weaning group. The other 27 animals were sired by multiparous females, 13 from the early weaning group and 14 from the conventional weaning group. Weight (kg) and semen collections were performed at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, using a digital scale and the electroejaculation technique, respectively. The animals were classified as pubertal when they presented at least 10% subjective motility and 50 million sperm in the ejaculate. Statistical analyses were performed using SAS software (Version 9.2; SAS Institute), using the ANOVA test applying a mixed model (PROC MIXED). When a significant treatment effect was detected, the means were compared by Fisher's method of least significant difference for multiple comparisons. For weight, the results were expressed as mean $\pm$ standard error, and for puberty, the percentages of each subpopulation in the sample were calculated. The effects of mother, weaning, age and interaction between them were analyzed and considered as significant difference when $P \leq 0.05$. For weight, there was an effect for mother category ($p=0.01$), with the data expressed as mean $\pm$ standard error: $332.8^a \pm 5.2$ and $311.0^b \pm 4.6$ kg in males from multiparous and primiparous hens, respectively. Furthermore, there was also an age effect ($p<0.01$): $267.9^d \pm 4.0$, $304.1^c \pm 4.2$, $334.7^b \pm 4.4$ and $381.4^a \pm 4.7$ kg when evaluated at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, respectively. For puberty, there was no effect of mother category, weaning type or interactions ($p>0.05$), however there was an age effect ($p<0.01$), accumulating the percentage of 7.2^b, 28.7^b, 48.2^{ab} and 71.2^a% when the animals were evaluated at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, respectively. As expected, the results of the present study demonstrate that the animals gained more weight as the months passed. Furthermore, the offspring of multiparous cows benefited when the weight of these animals was analyzed. However, although weight is commonly associated with the animals' entry into puberty, since it indicates which animals are better adapted to the environmental conditions in which they live, and which are expected to have more developed spermatogenesis, animals from multiparous cows did not become pubertal earlier. The puberty data show that early or conventional weaning in both classes of mothers did not provide a fetal programming effect on the subsequent offspring of males of the Nelore breed.

Keywords: Cattle, Nelore, Puberty.

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

Sistemas de desmame em crias de fêmeas da raça Nelore e efeitos na programação fetal sobre as concentrações séricas de testosterona, IGF-1 e insulina nos machos da próxima progênie

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Paulo Mielli Bonacim¹, Guilherme Pugliesi², Felipe Zandonadi Brandão⁶, Isabella Rio Feltrin², Alexandre Rossetto Garcia³, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁴, Paulo Roberto Leme⁵, Arlindo Saran Netto⁵, Germán Darío Ramirez Zamudio⁵, 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; ³Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brasil; ⁴Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPAR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo - USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; ⁵Departamento de Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brasil, ⁶Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

*E-mail: arrudarp@usp.br

A programação fetal refere-se a qualquer estímulo ou lesão durante o desenvolvimento do feto que pode influenciar a saúde e o desempenho futuro da progênie, incluindo aspectos críticos para reprodução como a precocidade sexual e o desenvolvimento hormonal. A partir disso, o experimento tem como objetivos avaliar os efeitos da antecipação do desmame (150 dias/antecipado vs. 240 dias/convencional) das crias de vacas da raça Nelore (primíparas e múltiparas) sobre as concentrações séricas de testosterona, IGF-1 e insulina nos machos da próxima progênie (efeito na programação fetal). Foram submetidos aos efeitos do desmame antecipado ou convencional 56 bezerros, com idade média inicial de 12,5 meses. Dentre eles, 29 são provenientes de fêmeas primíparas, sendo 14 do grupo de desmame antecipado e 15 do grupo de desmame convencional. Os outros 27 animais foram gerados por fêmeas múltiparas, sendo 13 pertencentes ao grupo de desmame antecipado e 14 ao grupo de desmame convencional. As colheitas de sangue aconteceram aos 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, realizadas por venopunção jugular em tubos a vácuo siliconizados de 10 mL, sem anticoagulante, para determinar as concentrações séricas de testosterona, IGF-1 e insulina. 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 quando $P \leq 0,05$. Não houve efeito da categoria de mãe (primípara ou múltipara), tipo de desmame (antecipado ou convencional), ou das interações entre essas variáveis sobre as concentrações séricas de testosterona e IGF-1 ($p > 0,05$). No entanto, a idade dos animais influenciou as concentrações desses hormônios ($p < 0,01$), sendo os dados expressos como média $\pm$ erro padrão: $1,1^c \pm 0,1$, $4,5^b \pm 0,5$, $3,6^b \pm 0,4$ e $7,1^a \pm 0,7$ ng/mL de testosterona e $229,6^c \pm 8,7$, $238,6^c \pm 8,4$, $271,9^b \pm 7,4$ e $293,3^a \pm 6,4$ ng/mL de IGF-1, quando avaliados em 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, respectivamente. Em relação à insulina, houve interação entre a categoria de mãe e o tipo de desmame ($p = 0,02$), sendo que ao realizar o desmame antecipado, os animais provenientes de múltiparas apresentaram $1,24^a \pm 0,1$ e os filhos de primíparas $0,8^b \pm 0,1$ uIU/mL. Por outro lado, não houve diferença quando utilizado desmame convencional ($0,8 \pm 0,1$ e $1,0 \pm 0,1$, para animais oriundos de múltiparas e primíparas, respectivamente). De forma geral, houve redução da concentração de insulina ($p < 0,01$), conforme os animais ficaram mais velhos: $5,0^a \pm 0,4$, $3,4^b \pm 0,3$, $3,1^c \pm 0,5$ e $2,6^c \pm 0,3$, quando avaliados em 12,5, 14,3, 15,5 e 17,3 meses de idade, respectivamente. Com base nesses resultados, observa-se que as alterações no ambiente fetal, decorrentes da maior disponibilidade de nutrientes ao feto devido à interrupção antecipada da lactação, não resultaram em mudanças significativas nas concentrações séricas de testosterona e IGF-1 da progênie, sugerindo que no presente estudo, o desenvolvimento reprodutivo hormonal dos touros foi mais dependente do desenvolvimento fisiológico relacionado à idade. O desmame antecipado promoveu maior concentração de insulina em bezerros provenientes de vacas múltiparas, sugerindo um impacto positivo na alocação de nutrientes durante o início da gestação. Por outro lado, essa diferença não foi observada em bezerros de vacas primíparas, indicando que o desmame antecipado pode não ter sido suficiente para beneficiar significativamente essa categoria, a qual além de estar em desenvolvimento, precisa nutrir tanto a si mesmas quanto ao feto, enfrentando uma maior competição por recursos nutricionais.

Palavras-Chave: Bovinos, Desmame antecipado, Hormônios.

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

Weaning systems in Nelore female offspring and effects of fetal programming on serum concentrations of testosterone, IGF-1 and insulin in males of the next progeny

Alessandra Regina Carrer¹, Rubens Paes Arruda^{1*}, Paulo Mielli Bonacim¹, Guilherme Pugliesi², Felipe Zandonadi Brandão⁶, Isabella Rio Feltrin², Alexandre Rossetto Garcia³, Eneiva Carla Carvalho Celeghini⁴, Paulo Roberto Leme⁵, Arlindo Saran Netto⁵, Germán Darío Ramirez Zamudio⁵, 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; ³Animal Reproduction Laboratory, Embrapa Pecuária Sudeste – EMBRAPA, São Carlos, SP, Brazil; ⁴Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; ⁵Department of Animal Science, College of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo – USP, FZEA, Pirassununga, SP, Brazil, ⁶Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

*E-mail: arrudarp@usp.br

Fetal programming refers to any stimulus or injury during fetal development that can influence the health and future performance of the progeny, including critical aspects for reproduction such as sexual precocity and hormonal development. Based on this, the experiment aims to evaluate the effects of early weaning (150 days/early vs. 240 days/conventional) of calves of Nelore cows (primiparous and multiparous) on serum concentrations of testosterone, IGF-1 and insulin in males of the next progeny (effect on fetal programming). Fifty-six calves, with an initial average age of 12.5 months, were subjected to the effects of early or conventional weaning. Of these, 29 came from primiparous females, 14 from the early weaning group and 15 from the conventional weaning group. The other 27 animals were sired by multiparous females, 13 of which belonged to the early weaning group and 14 to the conventional weaning group. Blood samples were collected at 12.5, 14.3, 15.5, and 17.3 months of age by jugular venipuncture in 10 mL siliconized vacuum tubes, without anticoagulant, to determine serum concentrations of testosterone, IGF-1, and insulin. Statistical analyses were performed using SAS software (Version 9.2; SAS Institute), and analyzed using 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. Differences were considered when $P \leq 0.05$. There was no effect of mother category (primiparous or multiparous), type of weaning (early or conventional), or interactions between these variables on serum testosterone and IGF-1 concentrations ($p > 0.05$). However, the age of the animals influenced the concentrations of these hormones ($p < 0.01$), with data expressed as mean $\pm$ standard error: $1.1^c \pm 0.1$, $4.5^b \pm 0.5$, $3.6^b \pm 0.4$ and $7.1^a \pm 0.7$ ng/mL of testosterone and $229.6^c \pm 8.7$, $238.6^c \pm 8.4$, $271.9^b \pm 7.4$ and $293.3^a \pm 6.4$ ng/mL of IGF-1, when evaluated at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, respectively. Regarding insulin, there was an interaction between the category of mother and the type of weaning ($p = 0.02$), and when early weaning was performed, animals from multiparous mothers presented $1.24^a \pm 0.1$ and those from primiparous mothers presented $0.8^b \pm 0.1$ uIU/mL. On the other hand, there was no difference when conventional weaning was used (0.8 ± 0.1 and 1.0 ± 0.1 , for animals from multiparous and primiparous mothers, respectively). In general, there was a reduction in insulin concentration ($p < 0.01$) as the animals aged: $5.0^a \pm 0.4$, $3.4^b \pm 0.3$, $3.1^c \pm 0.5$ and $2.6^c \pm 0.3$, when evaluated at 12.5, 14.3, 15.5 and 17.3 months of age, respectively. Based on these results, it is observed that changes in the fetal environment, resulting from greater availability of nutrients to the fetus due to early interruption of lactation, did not result in significant changes in serum testosterone and IGF-1 concentrations of the progeny, suggesting that in the present study, the hormonal reproductive development of bulls was more dependent on age-related physiological development. Early weaning promoted higher insulin concentrations in calves from multiparous cows, suggesting a positive impact on nutrient allocation during early gestation. On the other hand, this difference was not observed in calves from primiparous cows, indicating that early weaning may not have been enough to significantly benefit this category, which, in addition to being in development, needs to nourish both themselves and the fetus, facing greater competition for nutritional resources.

Keywords: Cattle, Early Weaning, Hormones.

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

Relato de caso: Neoplasia testicular maligna incomum em touro Nelore

**Ricardo Araújo Mical¹, Adolfo Firmo Ferreira¹, Ana Clara Faquineli Cavalcante¹, Neimar Correa Severo²,
Larissa Nunes Oliveira², Renata Lanconi^{2*}**

¹Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil.

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

O relato de caso descreve a ocorrência observada em um touro da raça Nelore de 8 anos de idade presente em uma central de coleta de sêmen. O touro em questão de alto valor genético dentro da raça não possuía histórico de doenças ou alterações em sistema reprodutor, tendo a média de produção de 2.000 doses convencionais por semana. Inicialmente foi observada alteração no aspecto do ejaculado, tendo a coloração de sangue hemolisado “amarronzada” (hemospermia). No total foram avaliados 8 ejaculados em diferentes datas (01/04/24, 09/04/24, 06/05/24, 10/06/24, 12/06/24, 14/06/24, 20/06/24, 05/08/24), sendo que a hemospermia sempre estava presente. O método para detecção de hemácias foi o esfregaço sanguíneo em lâmina com o uso do panótico rápido para coloração e confirmação. Na análise da qualidade do sêmen via CASA IVOS[®] foram observadas variações na motilidade progressiva (57%, 55%, 39%, 53%, 56%, 55%, 58%, 71%). Nesse período o animal foi encaminhado para o exame clínico do aparelho reprodutor em busca de alterações que pudessem mostrar a origem do sangue presente no sêmen. No exame físico dos testículos não foi observada alterações na palpação, sendo que a mobilidade e consistência eram normais, seguido de ausência de dor. Com o auxílio do ultrassom Sonoscape E2VPro[®] com transdutor linear foi feito o escaneamento do parênquima testicular para avaliação da ecogenicidade das estruturas presentes, tendo observado espessamento do mediastino testicular esquerdo (6,9 mm) com presença de conteúdo hiperecótico. As aferições de espessura foram feitas em dias intervalados com os seguintes resultados (7,26 mm, 9,82 mm, 9,01mm, 8,04 mm, 7,00 mm). Utilizou-se também termografia, onde foi encontrado aumento da temperatura na região equivalente ao local da alteração interna. Após tratamento paliativo com vitamina k e repouso sexual por 30 dias, seguido de coleta para nova avaliação do sêmen sem perspectiva de melhora, foi feita a opção pelo procedimento de orquiectomia unilateral. O testículo removido foi encaminhado para o exame histopatológico e o posterior laudo descreveu como neoplasia maligna incomum diferenciada.

Palavras-chave: tumor, mediastino alterado, hemospermia.

Case Report: Unusual malignant testicular neoplasm in Nelore bull

**Ricardo Araújo Mical¹, Adolfo Firmo Ferreira¹, Ana Clara Faquineli Cavalcante¹, Neimar Correa Severo²,
Larissa Nunes Oliveira², Renata Lanconi^{2*}**

¹Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

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

This case report describes the occurrence of hemospermia in 8 years old Nelore bull housed at a semen collection center. The animal, of high genetic value within the breed, had no history of disease or abnormalities in the reproductive system and produced an average of 2.000 conventional semen doses per week. The first sign of the condition was a change in the appearance of the ejaculate, which showed a brownish color typical of hemolyzed blood (hemospermia). In total of 8 ejaculates were evaluated on different dates (01/04/24, 09/04/24, 06/05/24, 10/06/24, 12/06/24, 14/06/24, 20/06/24, 05/08/24), all of which presented hemospermia. The detection of erythrocytes was carried out through blood smear analysis using rapid panoptic staining for confirmation. Semen quality analysis, performed using the CASA IVOS® system, revealed variations in progressive motility (57%, 55%, 39%, 53%, 56%, 55%, 58%, and 71%). During this period the animal underwent a clinical examination of the reproductive system to investigate the source of the blood in the semen. Physical examination of the testicles revealed no abnormalities upon palpation, mobility and consistency were normal, and no pain was observed. Using the Sonoscape E2VPro® ultrasound device with a linear transducer, a scan of the testicular parenchyma was performed to assess the echogenicity of internal structures thickening of the left testicular mediastinum (6.9 mm) with hyperechoic content was observed. Measurements of mediastinal thickness were taken at different time points, with the following results (7.26 mm, 9.82 mm, 9.01 mm, 8.04 mm, and 7.00 mm). Thermographic imaging was also employed, revealing an increase in temperature in the region corresponding to the internal alteration. After a palliative treatment consisting of vitamin k therapy and sexual rest for 30 days, followed by semen collection with no improvement observed, a unilateral orchiectomy was performed. The removed testis was sent for histopathological analysis, which resulted in the diagnosis of an uncommon differentiated malignant neoplasm.

Keywords: tumor, altered mediastinum, hemospermia.

Biomarcadores seminais da puberdade em touros nelore: uma abordagem proteômica comparativa

Viviane Maria Codognoto¹, Carolina Scott¹, Laíza Sartori de Camargo¹, Jaqueline Cândido de Carvalho¹, Viviana Helena Vallejo Aristizabal¹, Marcos Gomides de Carvalho¹, Mark Baker², André Maciel Crespilho³, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo. ²New Castle University, Australia. ³Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo

*E-mail: viviane.codognoto@unesp.br

A maturidade sexual em touros é atingida por volta de 24 meses de idade e a partir desta fase os animais são considerados aptos ou não para reprodução. Apesar disso, selecionar touros jovens, anterior à puberdade, é uma forma de evitar gastos com animais que serão descartados da reprodução. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar o proteoma dos espermatozoides e do plasma seminal de touros pré-púberes, a fim de utilizar biomarcadores para selecionar reprodutores na vida adulta. Para tal, foram realizadas sucessivas colheitas do sêmen de 20 touros Nelores, mantidos sob as mesmas condições, a cada 60 dias, entre 12 a 24 meses de idade, totalizando 7 colheitas. Após a colheita, o sêmen foi analisado quanto a cinética espermática pelo método computadorizado (CASA, IVOS-HTM 12, Hamilton Thorne Research); integridade da membrana plasmática e do acrossomo avaliada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídeo (P4170, Sigma Aldrich, USA), FITC-PSA (L0770, Sigma Aldrich, USA) e Hoechst 33342 (H14533, Sigma Aldrich, USA); e morfologia espermática. Com base nos parâmetros seminais e a qualidade espermática, aos 24 meses de idade, foram selecionados 5 animais considerados em puberdade precoce (EARLY) e 5 em puberdade tardia (LATE). Os grupos foram comparados pela ANOVA seguida por teste de Tukey ($P < 0,05$); e teste qui-quadrado para definir o momento em que os animais apresentaram maior qualidade espermática, utilizando software GraphPad Prism. Para estudar o proteoma, amostras de espermatozoides e do plasma seminal foram digeridas com tripsina e analisadas por espectrometria de massas NanoLC-MS/MS (Thermo Exploris 480, Orbitrap), com abordagem *shotgun*. Na etapa de MS1, aplicou-se varredura de 400–1200 m/z, com tolerância de 10 ppm, permitindo até duas clivagens perdidas e modificações dinâmicas como carbamidometilação, acetilação, desaminação, fosforilação, oxidação e metilação. Na etapa de MS2, os peptídeos foram fragmentados por HCD, com tolerância de 0,02 Da e sem exclusão dinâmica. A identificação considerou FDR de 1% e a quantificação foi feita por LFQ com alinhamento de tempo de retenção. Os resultados da espectrometria de massas foram normalizados e analisados no *MetaboAnalyst* 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) por análise univariada (teste t) e multivariada (análise de componente principal [PCA], dendrograma e análise de quadrados mínimos parciais [PLS-DA] seguido por VIP score). Foram identificadas 1.506 proteínas no plasma seminal e 2.242 nos espermatozoides. A PCA do plasma seminal ($PC1 + PC2 = 78,8\%$) revelou uma separação entre os grupos LATE e EARLY, confirmada pelo dendrograma, enquanto nos espermatozoides ($PC1 + PC2 = 54,5\%$) houve sobreposição entre os grupos. A PLS-DA apontou 25 proteínas menos abundantes no plasma seminal do grupo EARLY, enquanto, nas células espermáticas, a maioria das 25 proteínas selecionadas apresentou menor abundância no grupo LATE, sendo elas: SPADH1, SPP1, CLU, MSMB, SFP1, B4GALT4, TPMT, TIMP2, BSP-30K, PIGR, WFDC2, PYY2, SFP3, CFH, C3, LOC104975830, BPIFB1, SERPINE2. De acordo com os resultados preliminares, foram identificadas proteínas no plasma seminal e espermatozoides associadas à precocidade sexual em animais pré-púberes. De acordo com os resultados preliminares, foram identificadas proteínas no plasma seminal e espermatozoides associadas à precocidade sexual em animais pré-púberes. Essas proteínas apresentam funções predominantemente reguladoras e estão envolvidas em vias biológicas como sistema complemento (CFH, C3), resposta imune da mucosa e proteção epitelial (BPIFB1, PIGR), regulação da matriz extracelular e remodelamento tecidual (TIMP2, SERPINE2), e resposta inflamatória associada ao desenvolvimento do sistema reprodutivo (SPP1, CLU, MSMB). Esses achados indicam o potencial dessas proteínas como biomarcadores de maturação sexual precoce, destacando vias imunológicas e de remodelamento tecidual como centrais nesse processo.

Palavras-chave: Espectrometria de massas, espermatozoide, plasma seminal, precocidade sexual, proteínas.

Agradecimentos: Agradecemos ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (código de financiamento 001) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2017/22707-0).

Seminal biomarkers of puberty in Nellore bulls: a comparative proteomic approach

Viviane Maria Codognoto¹, Carolina Scott¹, Laíza Sartori de Camargo¹, Jaqueline Cândido de Carvalho¹, Viviana Helena Vallejo Aristizabal¹, Marcos Gomides de Carvalho¹, André Maciel Crespilho³, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo. ²New Castle University, Australia. ³Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo

*E-mail: viviane.codognoto@unesp.br

Bulls reach sexual maturity at approximately 24 months of age, and from this stage onwards, animals are considered suitable for reproduction or not. Nevertheless, selecting young bulls, before puberty, is a way to avoid spending on animals that will be discarded from reproduction. Thus, this study aimed to analyze the proteome of sperm and seminal plasma of prepubertal bulls, in order to use biomarkers to select adult bulls. To this end, successive semen collections were performed every 60 days from 20 Nellore bulls, kept under the same conditions, between 12 and 24 months of age, totaling seven collections. After collection, the semen was analyzed for sperm kinetics using a computerized method (CASA, IVOS-HTM 12, Hamilton Thorne Research); plasma membrane and acrosome integrity assessed by flow cytometry using propidium iodide (P4170, Sigma Aldrich, USA), FITC-PSA (L0770, Sigma Aldrich, USA) and Hoechst 33342 (H14533, Sigma Aldrich, USA); and sperm morphology. Based on seminal parameters and sperm quality, at 24 months of age, five animals considered in precocious puberty (EARLY) and 5 in late puberty (LATE) were selected. The groups were compared by ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$) and chi-square test to define the moment the animals presented higher sperm quality, using GraphPad Prism software. To study the proteome, sperm and seminal plasma samples were digested with trypsin and analyzed by NanoLC-MS/MS mass spectrometry (Thermo Exploris 480, XXXX), with a shotgun approach. In the MS1 step, a 400–1200 m/z scan was applied, with a tolerance of 10 ppm, allowing up to two missed cleavages and dynamic modifications such as carbamidomethylation, acetylation, deamination, phosphorylation, oxidation, and methylation. In the MS2 step, the peptides were fragmented by HCD, with a tolerance of 0.02 Da and without dynamic exclusion. LFQ performed identification, considered a FDR of 1%, and quantification with retention time alignment. Mass spectrometry results were normalized and analyzed in MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) by univariate (t-test) and multivariate analysis (principal component analysis [PCA], dendrogram, and partial least squares analysis [PLS-DA] followed by VIP score). A total of 1,506 proteins were identified in seminal plasma and 2,242 in sperm. PCA of seminal plasma ($PC1 + PC2 = 78.8\%$) revealed a separation between LATE and EARLY groups, confirmed by the dendrogram, while in sperm ($PC1 + PC2 = 54.5\%$), there was overlap between the groups. PLS-DA identified 25 less abundant proteins in the seminal plasma of the EARLY group, while in sperm cells, most of the 25 selected proteins showed lower abundance in the LATE group, namely: SPADH1, SPP1, CLU, MSMB, SFP1, B4GALT4, TPMT, TIMP2, BSP-30K, PIGR, WFDC2, PYY2, SFP3, CFH, C3, LOC104975830, BPIFB1, SERPINE2. According to the preliminary results, proteins associated with sexual precocity in prepubertal animals were identified in seminal plasma and sperm. These proteins have predominantly regulatory functions and are involved in biological pathways such as the complement system (CFH, C3), mucosal immune response and epithelial protection (BPIFB1, PIGR), extracellular matrix regulation and tissue remodeling (TIMP2, SERPINE2), and inflammatory response associated with reproductive system development (SPP1, CLU, MSMB). These findings indicate the potential of these proteins as biomarkers of early sexual maturation, highlighting immunological and tissue remodeling pathways as central to this process.

Keywords: Mass spectrometry, sperm, seminal plasma, sexual precocity, proteins.

Acknowledgements: The authors thank for the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (financing code 001) and of the São Paulo Research Foundation (FAPESP, process 2017/22707-0)

Comparação das características seminais de touros das raças Aberdeen Angus, Holandês e Nelore antes e após a criopreservação

Dyana Muniz Carvalho¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Karen Monise França da Luz¹, Diego André Costa Saranholi¹, André Maciel Crespilho², Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná - Brasil

²Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo, Brasil

*E-mail: thalesrigo@uenp.edu.br

A utilização de sêmen bovino congelado representa a principal biotécnica reprodutiva para melhoramento genético animal. No entanto, o processo de criopreservação pode causar danos aos espermatozoides, que refletem em uma diminuição de aproximadamente 50% da motilidade espermática. Portanto, é essencial selecionar touros reprodutores capazes de produzir ejaculados resistentes à criopreservação e manter alta viabilidade espermática e capacidade fertilizante após a descongelação. Este estudo teve como objetivo avaliar parâmetros de motilidade e vigor de sêmen fresco e após a descongelação de touros Aberdeen Angus, Holandês e Nelore. Foram utilizados 39 touros: Aberdeen Angus (n=13), Holandês (n=13) e Nelore (n=13). A colheita de sêmen foi realizada por vagina artificial (IMV Technologies, França) duas vezes/semana, totalizando 792 colheitas de sêmen, sendo 307 para touros Aberdeen Angus, 225 para touros Holandês e 260 para touros Nelore. Após colheita, o sêmen fresco foi avaliado quanto a motilidade e vigor por microscopia óptica (Olympus® BX53, Japão) e concentração espermática por contador de células automático (Counter® SP-100™). Os ejaculados foram diluídos em meio específico para congelamento de sêmen bovino (Optixcell 2®, IMV Technologies, França) e submetidos a uma curva de refrigeração padronizada, com duração de 3 horas, até atingirem a temperatura de 4 °C. Após esse período, permaneceram nessa temperatura até o envase automatizado das palhetas, realizado pelo sistema IMV-MRS4® (IMV Technologies, França). Em seguida, as amostras foram submetidas à curva de congelamento no equipamento Digitcool® (IMV Technologies, França), com taxa de refrigeração controlada de -12,4 °C/min, até atingir -145 °C. Após a criopreservação, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, e a motilidade progressiva foi avaliada por meio do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey, considerando $P < 0.05$. A análise do sêmen fresco não revelou diferença significativa na motilidade espermática entre as raças avaliadas (Aberdeen Angus: $75,6 \pm 3,8$; Holandês: $76,8 \pm 3,4$; Nelore: $76,0 \pm 3,4$; $P = 0,053$). No entanto, observou-se menor vigor nos ejaculados dos touros da raça Holandesa em comparação às demais (Aberdeen Angus: $4,9 \pm 0,3$; Holandês: $4,8 \pm 0,3$; Nelore: $4,9 \pm 0,2$; $P = 0,024$). Também foi identificada diferença significativa na concentração espermática entre as raças (Aberdeen Angus: $818,2 \pm 367,1$; Holandês: $973,8 \pm 343,5$; Nelore: $1.173,7 \pm 516,3$; $P < 0,001$). Nas amostras avaliadas após a descongelação, observou-se diferença significativa na motilidade entre os touros das raças Holandesa e Nelore (Aberdeen Angus: $50,4 \pm 9,3$; Holandês: $53,6 \pm 9,8$; Nelore: $49,3 \pm 9,1$; $P < 0,001$), enquanto os valores obtidos pelos touros da raça Angus foram estatisticamente semelhantes aos das demais raças. A comparação entre os valores de motilidade do sêmen fresco e pós-descongelação evidenciou maior variação percentual nos touros das raças Nelore ($26,0 \pm 8,9\%$) e Angus ($25,3 \pm 8,4\%$), com diferença significativa ($P < 0,001$) em relação aos touros da raça Holandesa ($20,6 \pm 9,3\%$), que apresentaram a menor variação entre as análises. Em relação ao vigor, não foram observadas diferenças significativas entre as raças na comparação entre o sêmen fresco e o descongelado ($P = 0,13$). O processo de criopreservação do sêmen reduziu os parâmetros espermáticos do sêmen e estas perdas de qualidade sofrem interferência de acordo com as raças avaliadas.

Palavras-chave: Congelamento; Bovino; *Bos taurus*; *Bos indicus*.

Agradecimentos: A Central Bela vista pelo apoio à pesquisa

Comparison of seminal characteristics of Aberdeen Angus, Holstein and Nelore bulls before and after cryopreservation

Dyana Muniz Carvalho¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Karen Monise França da Luz¹, Diego André Costa Saranholi¹, André Maciel Crespilho², Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná - Brazil

²Central Bela Vista, Botucatu, São Paulo, Brazil

*E-mail: thalesrigo@uenp.edu.br

The use of frozen bovine semen represents the main reproductive biotechnique for animal genetic improvement. However, the cryopreservation process can cause damage to sperm, which reflect a decrease of approximately 50% of sperm motility. Furthermore, it is essential to select breeding bulls capable of producing cryopreservation-resistant ejaculates and maintaining high sperm viability and fertilizing capacity after thawing. This study aimed to evaluate motility and vigor parameters of fresh and post-thawed semen of Aberdeen Angus, Holstein and Nelore bulls. Thirty-nine bulls were used: Aberdeen Angus (n=13), Dutch (n=13) and Nelore (n=13). Semen collection was performed using an artificial vagina (IMV Technologies, France) twice/week, totaling 792 semen collections, 307 from Aberdeen Angus bulls, 225 from Holstein bulls and 260 from Nelore bulls. After semen collection, fresh semen was evaluated for motility and vigor by optical microscopy (Olympus® BX53, Japan) and sperm concentration by automatic cell counter (Counter® SP-100™). The ejaculates were diluted in a commercial extender for freezing bovine semen (Optixcell 2®, IMV Technologies, France) and subjected to a standardized cooling curve for 3 hours until they reached 4°C. After that, they remained at this temperature until the straws were automatically filled using the IMV-MRS4® system (IMV Technologies, France). The samples were then subjected to the freezing curve using the Digitcool® equipment (IMV Technologies, France) with a controlled cooling rate of -12.4°C/min until they reached -145°C. After cryopreservation, the samples were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds, and progressive motility was assessed using the CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) system. The data were subjected to analysis of variance and compared using the Tukey test, considering $P < 0.05$. Analysis of fresh semen revealed no significant difference in sperm motility among the breeds evaluated (Aberdeen Angus: 75.6 ± 3.8 ; Holstein: 76.8 ± 3.4 ; Nelore: 76.0 ± 3.4 ; $P=0.053$). However, lower vigor was observed in the ejaculates of Holstein bulls compared to the others (Aberdeen Angus: 4.9 ± 0.3 ; Holstein: 4.8 ± 0.3 ; Nelore: 4.9 ± 0.2 ; $P=0.024$). A significant difference in sperm concentration was also identified between breeds (Aberdeen Angus: 818.2 ± 367.1 ; Holstein: 973.8 ± 343.5 ; Nelore: $1,173.7 \pm 516.3$; $P<0.001$). In the samples evaluated after thawing, significant differences in motility were observed between Holstein and Nelore bulls (Aberdeen Angus: 50.4 ± 9.3 ; Holstein: 53.6 ± 9.8 ; Nelore: 49.3 ± 9.1 ; $P<0.001$), while the values obtained by Angus bulls were statistically similar to the other breeds. The comparison between the motility values of fresh and post-thawed semen showed a greater percentage variation in the Nelore ($26.0 \pm 8.9\%$) and Angus bulls ($25.3 \pm 8.4\%$), with a significant difference ($P<0.001$) in relation to Holstein bulls ($20.6 \pm 9.3\%$), which confirmed the smaller variation between the analyses. Regarding vigor, no significant differences were observed between the breeds in the comparison between fresh and thawed semen ($P=0.13$). The semen cryopreservation process causes a decrease in the physical parameters of the semen and these quality losses suffer interference according to the breeds.

Keywords: Freezing; Bovine; *Bos taurus*; *Bos indicus*.

Acknowledgment: The Bela Vista center for supporting the research.

Seminal biomarkers of puberty in Nellore bulls: a comparative proteomic approach

Viviane Maria Codognoto¹, Carolina Scott¹, Laíza Sartori de Camargo¹, Jaqueline Cândido de Carvalho¹,
Viviana Helena Vallejo Aristizabal¹, Marcos Gomides de Carvalho¹, Fabiana Ferreira de Souza¹

¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, São Paulo.

*E-mail: viviane.codognoto@unesp.br

Bulls reach sexual maturity at approximately 24 months of age, and from this stage onwards, animals are considered suitable for reproduction or not. Nevertheless, selecting young bulls, before puberty, is a way to avoid spending on animals that will be discarded from reproduction. Thus, this study aimed to analyze the proteome of sperm and seminal plasma of prepubertal bulls, in order to use biomarkers to select adult bulls. To this end, successive semen collections were performed every 60 days from 20 Nellore bulls, kept under the same conditions, between 12 and 24 months of age, totaling seven collections. After collection, the semen was analyzed for sperm kinetics using a computerized method (CASA, IVOS-HTM 12, Hamilton Thorne Research); plasma membrane and acrosome integrity assessed by flow cytometry using propidium iodide (P4170, Sigma Aldrich, USA), FITC-PSA (L0770, Sigma Aldrich, USA) and Hoechst 33342 (H14533, Sigma Aldrich, USA); and sperm morphology. Based on seminal parameters and sperm quality, at 24 months of age, five animals considered in precocious puberty (EARLY) and 5 in late puberty (LATE) were selected. The groups were compared by ANOVA followed by Tukey's test ($P < 0.05$) and chi-square test to define the moment the animals presented higher sperm quality, using GraphPad Prism software. To study the proteome, sperm and seminal plasma samples were digested with trypsin and analyzed by NanoLC-MS/MS mass spectrometry (Thermo Exploris 480, XXXX), with a shotgun approach. In the MS1 step, a 400–1200 m/z scan was applied, with a tolerance of 10 ppm, allowing up to two missed cleavages and dynamic modifications such as carbamidomethylation, acetylation, deamination, phosphorylation, oxidation, and methylation. In the MS2 step, the peptides were fragmented by HCD, with a tolerance of 0.02 Da and without dynamic exclusion. LFQ performed identification, considered a FDR of 1%, and quantification with retention time alignment. Mass spectrometry results were normalized and analyzed in MetaboAnalyst 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) by univariate (t-test) and multivariate analysis (principal component analysis [PCA], dendrogram, and partial least squares analysis [PLS-DA] followed by VIP score). A total of 1,506 proteins were identified in seminal plasma and 2,242 in sperm. PCA of seminal plasma ($PC1 + PC2 = 78.8\%$) revealed a separation between LATE and EARLY groups, confirmed by the dendrogram, while in sperm ($PC1 + PC2 = 54.5\%$), there was overlap between the groups. PLS-DA identified 25 less abundant proteins in the seminal plasma of the EARLY group, while in sperm cells, most of the 25 selected proteins showed lower abundance in the LATE group, namely: SPADH1, SPP1, CLU, MSMB, SFP1, B4GALT4, TPMT, TIMP2, BSP-30K, PIGR, WFDC2, PYY2, SFP3, CFH, C3, LOC104975830, BPIFB1, SERPINE2. According to the preliminary results, proteins associated with sexual precocity in prepubertal animals were identified in seminal plasma and sperm. These proteins have predominantly regulatory functions and are involved in biological pathways such as the complement system (CFH, C3), mucosal immune response and epithelial protection (BPIFB1, PIGR), extracellular matrix regulation and tissue remodeling (TIMP2, SERPINE2), and inflammatory response associated with reproductive system development (SPP1, CLU, MSMB). These findings indicate the potential of these proteins as biomarkers of early sexual maturation, highlighting immunological and tissue remodeling pathways as central to this process.

Keywords: Mass spectrometry, sperm, seminal plasma, sexual precocity, proteins.

Acknowledgements: To the São Paulo Research Foundation (FAPESP, process 2017/22707-0)

Isolamento mitocondrial de espermatozoides de touros: otimização do protocolo e perfil proteômico

Yasmin El Hayek-Martins¹, Saurabh Tiwari², André Maciel Crespilho^{3,4}, Marcos Gomides Carvalho¹, Paulina Betancur Guerra¹, John Patrick Kastelic², Jacob Chacko Thundathil², Angelo Gardim de Cesare⁵, Fabiana Ferreira De Souza^{1*}

¹Departamento de Cirurgia e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brasil;

²Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary (UofC), Calgary, Alberta, Canada;

³Universidade de Santo Amaro (UNISA), São Paulo, São Paulo, Brasil; ⁴Central Bela Vista (Grupo CRV), Botucatu, São Paulo, Brasil; ⁵Agropecuária Ribeirópolis, Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil

*E-mail: fabiana.f.souza@unesp.br

As mitocôndrias desempenham um papel central na fisiologia dos espermatozoides, sendo responsáveis pelo suprimento energético necessário à motilidade, capacitação, reação acrossômica e fecundação. Nos espermatozoides bovinos, essas organelas estão densamente compactadas na peça intermediária, formando uma bainha mitocondrial composta por três giros helicoidais, contendo entre 22 e 75 mitocôndrias alinhadas de ponta a ponta e ocupando aproximadamente 80% do volume dessa região. O isolamento mitocondrial constitui, portanto, uma etapa crítica em estudos funcionais e proteômicos envolvendo espermatozoides. Este estudo teve como objetivo avaliar um protocolo de isolamento mitocondrial adaptado para espermatozoides bovinos, com foco na caracterização proteômica e na análise das perdas associadas ao processo. Palhetas de sêmen congelado de 11 touros da raça Nelore, utilizados em programas comerciais de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), foram descongeladas e avaliadas quanto motilidade total por meio de análise computadorizada (CASA; IVOS I, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Em seguida, as amostras foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e centrifugadas três vezes a $700 \times g$ por 10 minutos, em temperatura ambiente para remoção do diluente. O protocolo de isolamento mitocondrial, adaptado para células espermáticas, foi então iniciado com o pellet resultante da lavagem, utilizando tampão de sacarose (1 M sacarose [20 mL], 1 M Tris-HCl pH 7,4 [10 mL], 0,1 M EDTA pH 7,4 ajustado com Tris [1 mL]; pH final 7,4), seguido de sonicação para ruptura da peça intermediária (probe de 3mm e 10% de amplitude, três ciclos de 15 segundos com 30 segundos de intervalo em banho de gelo; Sonifier Sound Enclosure Ultrasonics, Shanghai, China) e três etapas de centrifugação diferencial ($800 \times g$ por 10 minutos a 4°C , seguidas de duas centrifugações a $7.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C). Os sobrenadantes das duas últimas etapas (S1 e S2) foram coletados para avaliação das perdas de proteínas mitocondriais. Os pellets mitocondriais resultantes foram preparados para microscopia eletrônica de transmissão (MET) e, juntamente com os sobrenadantes, submetidos à análise por espectrometria de massas em tandem (nLC-MS/MS; Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A anotação funcional foi realizada com base na ontologia genética (GO), utilizando UniProt e ShinyGO v0.80, nas categorias de processo biológico, componente celular e função molecular. A análise da motilidade espermática revelou uma motilidade total variando de 52% a 85%, com média de $65,3\% \pm 12,8$, sendo valores considerados normais para a cinética do sêmen bovino descongelado. A MET confirmou a presença de mitocôndrias intactas e degeneradas, com contaminação mínima por detritos celulares e estruturas flagelares. No total, 767 proteínas foram identificadas no pellet mitocondrial, das quais 192 apresentaram anotação mitocondrial segundo a GO, as demais estavam associadas a componentes flagelares, do citoesqueleto, núcleo e citoplasma. A análise dos sobrenadantes revelou 614 proteínas em comum com o pellet, além de 34 proteínas exclusivas em S1, 12 em S2, e 9 proteínas compartilhadas entre ambas as frações, mas ausentes no pellet. A anotação GO qualitativa para o componente celular identificou 4 proteínas mitocondriais em S1 e 3 em S2, além de proteínas do citoplasma, núcleo, citosol e membrana plasmática. Concluiu-se que as perdas mitocondriais decorrentes da centrifugação são limitadas, mas não desprezíveis, devendo ser consideradas na utilização do protocolo. A presença de fragmentos flagelares e de mitocôndrias degeneradas reforça a necessidade de ajustes metodológicos no protocolo de isolamento mitocondrial por centrifugação diferencial em espermatozoides, sobretudo para análises funcionais, mas não compromete seu potencial para estudos proteômicos, representando um método promissor para o avanço dos conhecimentos mitocondriais em espermatozoides bovinos.

Palavras-chave: mitocôndria, sêmen, bovino, proteômica, isolamento celular

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 200922/2022-0). À empresa Agropecuária Rondonópolis por ceder as amostras para realização da pesquisa.

Mitochondrial isolation from bull sperm: protocol optimization and proteomic profile

Yasmin El Hayek-Martins¹, Saurabh Tiwari², André Maciel Crespilho^{3,4}, Marcos Gomides Carvalho¹, Paulina Betancur Guerra¹, John Patrick Kastelic², Jacob Chacko Thundathil², Angelo Gardim de Cesare⁵, Fabiana Ferreira De Souza^{1*}

¹Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil;

²Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary (UofC), Calgary, Alberta, Canada;

³University of Santo Amaro (UNISA), São Paulo, São Paulo, Brazil; ⁴Central Bela Vista, Semen Processing Center (CRV Group), Botucatu, São Paulo, Brazil; ⁵Agropecuária Riberópolis, Rondonópolis, Mato Grosso, Brazil

*E-mail: fabiana.f.souza@unesp.br

Mitochondria play a central role in sperm physiology, being responsible for the energy supply required for motility, capacitation, acrosome reaction, and fertilization. In bovine spermatozoa, these organelles are densely packed in the midpiece, forming a mitochondrial sheath composed of three helical turns, containing between 22 and 75 mitochondria aligned end-to-end and occupying approximately 80% of the volume of this region. Mitochondrial isolation is, therefore, a critical step in functional and proteomic studies involving spermatozoa. This study aimed to evaluate a mitochondrial isolation protocol adapted for bovine spermatozoa, focusing on proteomic characterization and the analysis of losses associated with the process. Frozen semen straws from 11 Nelore bulls used in commercial fixed-time artificial insemination (FTAI) programs were thawed and assessed for total motility using computer-assisted sperm analysis (CASA; IVOS I, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). Subsequently, the samples were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged three times at $700 \times g$ for 10 minutes at room temperature to remove the extender. The mitochondrial isolation protocol, adapted for sperm cells, was then initiated using the resulting pellet, employing a sucrose buffer (1 M sucrose [20 mL], 1 M Tris-HCl pH 7.4 [10 mL], 0.1 M EDTA pH 7.4 adjusted with Tris [1 mL]; final pH 7.4), followed by sonication to disrupt the midpiece (3 mm probe, 10% amplitude, three cycles of 15 seconds with 30-second intervals in an ice bath; Sonifier Sound Enclosure Ultrasonics, Shanghai, China) and three steps of differential centrifugation ($800 \times g$ for 10 minutes at 4°C , followed by two centrifugations at $7,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C). The supernatants from the last two steps (S1 and S2) were collected to assess mitochondrial protein loss. The resulting mitochondrial pellets were prepared for transmission electron microscopy (TEM) and, together with the supernatants, submitted to tandem mass spectrometry analysis (nLC-MS/MS; Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Functional annotation was performed based on gene ontology (GO), using UniProt and ShinyGO v0.80, within the categories of biological process, cellular component, and molecular function. Sperm motility analysis revealed total motility ranging from 52% to 85%, with a mean of $65.3\% \pm 12.8$, values considered normal for thawed bovine semen kinetics. TEM confirmed the presence of both intact and degenerated mitochondria, with minimal contamination by cellular debris and flagellar structures. A total of 767 proteins were identified in the mitochondrial pellet, of which 192 were annotated as mitochondrial according to GO; the remaining proteins were associated with flagellar, cytoskeletal, nuclear, and cytoplasmic components. Analysis of the supernatants revealed 614 proteins shared with the pellet, in addition to 34 exclusive proteins in S1, 12 in S2, and 9 proteins shared between both fractions but absent from the pellet. Qualitative GO annotation for the cellular component identified 4 mitochondrial proteins in S1 and 3 in S2, along with proteins from the cytoplasm, nucleus, cytosol, and plasma membrane. In conclusion, mitochondrial losses due to centrifugation are limited but not negligible and should be considered when applying the protocol. The presence of flagellar fragments and degenerated mitochondria reinforces the need for methodological adjustments in the differential centrifugation-based mitochondrial isolation protocol in spermatozoa, particularly for functional analyses. Nonetheless, these limitations do not compromise its potential for proteomic studies, representing a promising method for advancing mitochondrial research in bovine spermatozoa.

Keywords: mitochondria, semen, bovine, proteomics, cell isolation

Acknowledgements: To the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, process 200922/2022-0). To the company Agropecuária Rondonópolis for providing the samples for carrying out the research.

Efeito do escore de condição corporal, qualidade do sêmen e eficiência dos inseminadores na fertilidade de vacas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF): Resultados preliminares

Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Elisa Bueno¹, Victória Alice Bastos Primo¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná - Brasil

*E-mail: thalesrigo@uenp.edu.br

O uso de biotecnologias reprodutivas na pecuária brasileira vem ganhando grande destaque nos últimos tempos, com ênfase na inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Para que um programa de inseminação artificial em tempo fixo seja bem-sucedido, é fundamental garantir a boa qualidade do sêmen utilizado, um adequado escore de condição corporal (ECC) das fêmeas no momento da inseminação e a eficiência técnica dos profissionais responsáveis pelo procedimento. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do ECC, da qualidade do sêmen e da eficiência dos inseminadores sobre a fertilidade de vacas da raça Nelore submetidas à IATF. Para tal, foram utilizados dados retrospectivos da estação reprodutiva, provenientes de 114 fazendas localizadas nos estados de Minas Gerais e Goiás. No total, foram avaliadas 7.490 vacas Nelore múltiparas, com bezerro ao pé, submetidas a protocolos de IATF. A análise estatística foi conduzida por regressão logística binária, considerando as partidas de sêmen, o ECC e o inseminador como variáveis independentes, e a prenhez como variável dependente, com o objetivo de identificar efeitos principais e possíveis interações. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0.05$). Das 7.490 vacas avaliadas, 3.975 se tornaram gestantes, resultando em uma taxa geral de prenhez de 53.07%. A taxa de prenhez foi analisada conforme as variáveis propostas, buscando-se identificar os principais fatores associados à fertilidade. A qualidade do sêmen foi avaliada com base em 50 partidas de sêmen descongeladas, cujas taxas de prenhez variaram de 34.1% a 70.8%. As partidas foram classificadas em dois grupos experimentais, com base na média geral de prenhez: alta fertilidade (taxa superior a 53.07%; $n = 23$ partidas; 4.498 vacas) e baixa fertilidade (taxa inferior à média; $n = 27$ partidas; 2.992 vacas). Quanto à atuação dos 17 inseminadores, as taxas individuais de prenhez variaram de 42.7% a 62.7%. Esses profissionais também foram classificados em dois grupos: alta eficiência ($n = 8$ inseminadores; 3.569 vacas) e baixa eficiência ($n = 9$ inseminadores; 3.922 vacas), de acordo com o desempenho reprodutivo obtido. O escore de condição corporal (ECC) das vacas, avaliado no momento da IATF, também influenciou os resultados: vacas com $ECC \leq 2,5$ apresentaram taxa de prenhez de 51.4%; $ECC = 3,0$, 53.3% e $ECC \geq 3,0$, 57%. Embora não tenha sido identificada interação significativa entre as variáveis analisadas ($P > 0.05$), observou-se efeito significativo isolado da qualidade das partidas de sêmen (alta fertilidade: 61.4% vs. baixa fertilidade: 47.5%; $P < 0.001$), da eficiência dos inseminadores (alta: 56.3% vs. baixa: 49.4%; $P < 0.001$) e do ECC das vacas ($P = 0.05$) sobre a taxa de prenhez. A qualidade do sêmen, a condição corporal das vacas e a habilidade dos inseminadores são fatores determinantes para o sucesso de programas reprodutivos baseados em IATF.

Palavras-chave: andrologia, gestação, eficiência reprodutiva.

Effect of body condition score, semen quality and inseminator efficiency on the fertility of Nelore cows subjected to fixed-time artificial insemination (FTAI): Preliminary results

Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Elisa Bueno¹, Victória Alice Bastos Primo¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal – Universidade Estadual do Norte do Paraná, Paraná - Brazil

*E-mail: thalesrigo@uenp.edu.br

The use of reproductive biotechnologies in Brazilian livestock farming has been gaining prominence, with an emphasis on fixed-time artificial insemination (FTAI). For a fixed-time artificial insemination program to be successful, it is essential to ensure good quality of the semen used, an adequate body condition score (BCS) of the females at the time of insemination, and the efficiency of the professionals responsible for the procedure. The objective of this study was to evaluate the effect of BCS, semen quality, and efficiency of inseminators on the fertility of Nelore cows subjected to FTAI. For this purpose, retrospective data from the reproductive season were used, from 114 farms located in the states of Minas Gerais and Goiás. In total, 7,490 multiparous Nelore cows with calves at foot, subjected to FTAI protocols, were evaluated. Statistical analysis was conducted using binary logistic regression, considering semen batches, BCS and inseminator as independent variables, and pregnancy as dependent variable, with the aim of identifying main effects and possible interactions. The significance level adopted was 5% ($P < 0.05$). Of the 7,490 Nelore cows evaluated, 3,975 became pregnant, resulting in an overall pregnancy rate of 53.07%. The pregnancy rate was analyzed according to the proposed variables, identifying the main factors associated with fertility. Semen quality was evaluated based on 50 frozen-thawed semen batches, whose pregnancy rates ranged from 34.1% to 70.8%. The batches were classified into two experimental groups, based on the overall pregnancy average: high fertility (rate higher than 53.07%; $n = 23$ batches; 4,498 cows) and low fertility (rate lower than the average; $n = 27$ batches; 2,992 cows). Regarding the performance of the 17 inseminators, individual pregnancy rates ranged from 42.7% to 62.7%. These professionals were also classified into two groups: high efficiency ($n = 8$ inseminators; 3,569 cows) and low efficiency ($n = 9$ inseminators; 3,922 cows), according to the reproductive performance obtained. The body condition score (BCS) of the Nelore cows, assessed at the time of TAI, also influenced the results: cows with $BCS \leq 2.5$ had a pregnancy rate of 51.4%; $BCS = 3.0$, 53.3% and $BCS \geq 3.0$, 57%. Although no significant interaction was identified between the variables analyzed ($P > 0.05$), a significant isolated effect of semen batch quality (high fertility: 61.4% vs. low fertility: 47.5%; $P < 0.001$), inseminator efficiency (high: 56.3% vs. low: 49.4%; $P < 0.001$) and Nelore cow BCS ($P = 0.05$) on pregnancy rate was observed. Semen quality, cow body condition and inseminator skill are determining factors for the success of reproductive programs based on FTAI.

Keywords: andrology; pregnancy; reproductive efficiency.

Relação entre o perfil lipídico e a capacitação espermática em touros da raça Nelore

Alexandre da Rocha Bozzi¹, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹,
Fernanda Baatsch Nascimento¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Ellen Lara Miguel¹, Maíra Bianchi
Rodrigues Alves², Raissa Braido Rangel², Daniel Silva Antonelo³, Juliano Coelho da Silveira⁴, Felipe
Perecin⁴, André Furugen Cesar de Andrade⁵,
Rubens Paes de Arruda⁶, Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ²Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil, ³Lipid Marker Omics Science Ltda., Leme, SP, Brasil, ⁴Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ⁵Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ⁶Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil

*E-mail: celeghin@usp.br

O perfil lipídico desempenha um papel fundamental na funcionalidade espermática, influenciando a integridade estrutural, a fluidez da membrana e o metabolismo energético. Neste contexto, a capacitação espermática, processo fisiológico essencial para a fecundação, induz mudanças na estrutura e distribuição lipídica da membrana, bem como alterações funcionais que preparam os espermatozoides para a hiperativação da motilidade e a reação acrossomal. Assim, este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a relação entre as alterações morfofuncionais e composição lipídica durante os eventos da capacitação espermática em touros da raça Nelore. Amostras de sêmen de 12 touros (n = 36 ejaculados) foram analisadas antes (CO) e após a indução da capacitação espermática *in vitro* (CAP) quanto as características de motilidade por CASA (Hamilton Thorne®, IVOS II), aos eventos da capacitação por citometria de fluxo (BD AccuriC6) e lipidoma espermático. As avaliações do lipidoma foram conduzidas pela técnica de monitoramento de reações múltiplas (MRM-profiling) pela empresa Lipid Marker Omics Science Ltda. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A capacitação espermática provocou queda ($p < 0,0001$) na motilidade total ($91,91 \pm 0,58$ x $74,30 \pm 2,6\%$) e progressiva ($84,02 \pm 0,72$ x $67,73 \pm 2,62\%$), células rápidas ($91,40 \pm 0,64$ x $72,69 \pm 2,65\%$), velocidade curvilínea (VCL, $176,08 \pm 5,95$ x $148,83 \pm 5,06$ $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, $5,44 \pm 0,16$ x $4,59 \pm 0,18$ μm) e linearidade (LIN, $68,82 \pm 1,09$ x $74,05 \pm 1,18\%$), bem como reduziu velocidades progressiva (VSL, $117,43 \pm 3,04$ x $109,75 \pm 2,19$ $\mu\text{m/s}$, $p = 0,05$) e de trajeto (VAP, $118,76 \pm 2,58$ x $109,38 \pm 2,05$ $\mu\text{m/s}$, $p = 0,0003$) e aumentou ($p < 0,0001$) a desorganização dos fosfolípidios de membrana (Merocianina-540, $2,35 \pm 0,30$ x $5,36 \pm 0,51$), peroxidação lipídica (C11-Bodipy $581/591$, $0,33 \pm 0,03$ x $0,62 \pm 0,06$), efluxo de colesterol (Bodipy-Cholesterol, $3,82 \pm 0,39$ x $7,33 \pm 0,78$), translocação da fosfatidilserina (Annexina V, $0,10 \pm 0,03$ x $0,40 \pm 0,07$) e reação acrossomal (FITC-PSA, $0,41 \pm 0,05$ x $3,36 \pm 0,38$), e estas foram acompanhadas de alterações significativas na análise lipídica. Houve uma queda na abundância do perfil lipídico de forma geral das amostras CO se comparadas com as amostras CAP, com exceção da esteroilcarnitina (CAR 18:0) que foi mais abundante após a indução à capacitação *in vitro* (fold-change = 1,38, $p = 0,010$), podendo estar ligada a uma maior mobilização de ácidos graxos de cadeias longas para a beta-oxidação mitocondrial durante a ocorrência dos eventos relacionados à capacitação espermática. Em contrapartida, carnitinas de cadeia curta e média, como CAR(2:0) e CAR(10:3), foram mais abundantes nos espermatozoides não capacitados. Esses resultados mostram que há alteração na composição lipídica dos espermatozoides durante a capacitação espermática e destacam a importância da integração da lipidômica com outras técnicas de avaliação da qualidade espermática, colaborando com o entendimento das alterações no metabolismo de lipídios associados aos eventos da capacitação, na qual o remodelamento da membrana e a mobilização energética mediada são essenciais para que ocorra a hiperativação espermática e a reação acrossômica.

Palavras-chave: Espermatozoides, hiperativação, bovinos, perfil lipídico, reação acrossômica.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) auxílio à pesquisa regular (processo N°2023/01059-0), à Reprodux Laboratórios, Lipid Marker Omics Science e Alta Genetics Brasil.

Relationship between lipidomic profile and sperm capacitation in Nelore bulls

Alexandre da Rocha Bozzi¹, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Ellen Lara Miguel¹, Máira Bianchi Rodrigues Alves², Raissa Braido Rangel², Daniel Silva Antonelo³, Juliano Coelho da Silveira⁴, Felipe Perecin⁴, André Furugem Cesar de Andrade⁵, Rubens Paes de Arruda⁶, Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratory of Teaching and Research in Pathology of Reproduction, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ²Reproduction Biotechnology Laboratory, Department of Pathology, Reproduction and One Health, School of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, ³Lipid Marker Omics Science Ltda, Leme, São Paulo, Brasil, ⁴Laboratory of Molecular Morphophysiology and Development, Department of Veterinary Medicine, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ⁵Laboratory of Andrology and Technology of Swine Embryos, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ⁶Laboratory of Semen Biotechnology and Andrology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil

*E-mail: celeghin@usp.br

The lipid profile plays a fundamental role in sperm functionality by influencing structural integrity, membrane fluidity, and energy metabolism. In this context, sperm capacitation—an essential physiological process for fertilization—induces changes in the structure and lipid distribution of the membrane, as well as functional alterations that prepare spermatozoa for motility hyperactivation and the acrosome reaction. Thus, this study aimed to evaluate the relationship between morphofunctional changes and lipid composition during the events of sperm capacitation in Nelore bulls. Semen samples from 12 bulls ($n = 36$ ejaculates) were analyzed before (CO) and after in vitro sperm capacitation induction (CAP) regarding motility characteristics by CASA (Hamilton Thorne® software, IVOS II), sperm capacitation events by flow cytometry (BD AccuriC6), and the sperm lipidome. Lipidome assessments were performed using the multiple reaction monitoring technique (MRM-profiling) by the company Lipid Marker Omics Science Ltda. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, with a significance level set at 5%. Sperm capacitation resulted in a significant reduction ($P < 0.0001$) in total ($91.91 \pm 0.58 \times 74.30 \pm 2.6\%$) and progressive motility ($84.02 \pm 0.72 \times 67.73 \pm 2.62\%$), rapid cells ($91.40 \pm 0.64 \times 72.69 \pm 2.65\%$), curvilinear velocity (VCL, $176.08 \pm 5.95 \times 148.83 \pm 5.06 \mu\text{m/s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, $5.44 \pm 0.16 \times 4.59 \pm 0.18 \mu\text{m}$), linearity (LIN, $68.82 \pm 1.09 \times 74.05 \pm 1.18\%$), as well as decreased straight-line velocity (VSL, $117.43 \pm 3.04 \times 109.75 \pm 2.19 \mu\text{m/s}$, $p = 0.05$) and average path velocity (VAP, $118.76 \pm 2.58 \times 109.38 \pm 2.05 \mu\text{m/s}$, $p = 0.0003$), and increased ($p < 0.0001$) phospholipid disorder (Merocyanine-540, $2.35 \pm 0.30 \times 5.36 \pm 0.51$), lipid peroxidation (C11-Bodipy 581/591, $0.33 \pm 0.03 \times 0.62 \pm 0.06$), cholesterol efflux (Bodipy-Cholesterol, $3.82 \pm 0.39 \times 7.33 \pm 0.78$), phosphatidylserine translocation (Annexin V, $0.10 \pm 0.03 \times 0.40 \pm 0.07$), and acrosome reaction (FITC-PSA, $0.41 \pm 0.05 \times 3.36 \pm 0.38$). These events were accompanied by significant changes in the lipidomic analysis. There was a general reduction in lipid abundance in CO samples compared to CAP samples, except stearyl carnitine (CAR 18:0), which was more abundant after in vitro capacitation induction (fold-change = 1.38, $p = 0.010$). This compound may be associated with increased mobilization of long-chain fatty acids for mitochondrial beta-oxidation during sperm capacitation. Conversely, short and medium-chain carnitines, such as CAR(2:0) and CAR(10:3), were more abundant in non-capacitated spermatozoa. These findings indicate that sperm lipid composition is altered during capacitation and underscore the importance of integrating lipidomic analysis with other sperm quality assessment techniques. This integration contributes to a better understanding of lipid metabolism alterations associated with capacitation events, in which membrane remodeling and energy mobilization are essential for achieving sperm hyperactivation and the acrosome reaction.

Keywords: Spermatozoa, hyperactivation, cattle, lipid profile, acrosome reaction.

Acknowledgments: The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the regular research grant (process No. 2023/01059-0), Reprodux Laboratórios, Lipid Marker Omics Science, and Alta Genetics Brazil.

Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre os eventos da capacitação e o perfil lipídômico dos espermatozoides

Alexandre da Rocha Bozzi^{1*}, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹,
Fernanda Baatsch Nascimento¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Ellen Lara Miguel¹, Máira Bianchi
Rodrigues Alves², Raissa Braido Rangel², Daniel Silva Antonelo³, André Furugen Cesar de Andrade⁴,
Rubens Paes de Arruda⁵, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ²Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil, ³Lipid Marker Omics Science Ltda., Leme, SP, Brasil, ⁴Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ⁵Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil

*E-mail: celeghin@usp.br

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica essencial para a aplicação da inseminação artificial de forma ampla em bovinos, permitindo a disseminação genética de touros de alto valor. No entanto, esse processo induz alterações estruturais e funcionais significativas nos espermatozoides, impactando sua viabilidade e potencial fertilizante. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da criopreservação sobre os eventos da capacitação espermática e as alterações no perfil lipídico dos espermatozoides de touros da raça Nelore. Foram utilizadas três partidas de sêmen de 12 touros da raça Nelore (n=36) que foram submetidos a criopreservação por sistema automatizado (Tetakon, TK 3000 Plus[®], Uberaba, MG, Brasil) utilizando o diluidor Optidux (Reprodux Laboratórios Ltda, Itapira, SP, Brasil). As amostras de sêmen foram analisadas antes e após a criopreservação quanto as características de motilidade (CASA, software Hamilton Thorne[®], IVOS II), aos eventos da capacitação (citômetro de fluxo, BD AccuriC6) e lipidoma espermático. As avaliações do lipidoma foram conduzidas através da técnica de monitoramento de reações múltiplas (MRM-profiling) pela empresa Lipid Marker Omics Science Ltda. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido de Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. A criopreservação afetou significativamente a funcionalidade espermática, apresentando queda em motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), células rápidas (RAP), velocidade progressiva (VSL), linearidade (LIN) (P<0,0001) e frequência de batimento cruzado (BCF) (P=0,01). Quanto aos eventos relacionados à capacitação espermática, houve aumento (P<0,0001) na desorganização dos fosfolípidios de membrana (Merocianina-540), na peroxidação lipídica (C11-Bodipy 581/591) e no efluxo de colesterol (Bodipy-Cholesterol), além da translocação de fosfatidilserina (p=0,01, Annexina V). No entanto, apesar de ocorrer diminuição significativa na integridade de membranas (P<0,0001) e no potencial de membrana mitocondrial (JC-1), a criopreservação não impactou a ocorrência de reação acrossômica (FITC-PSA), indicando que os espermatozoides preservaram essa capacidade. A análise lipídômica revelou alterações na composição da membrana, com aumento na abundância de conjugados a carnitina (CAR), fosfatidilcolinas (PC), diacilglicerídeos (DG), fosfatidiletalaminas (PE) e esfingomielinas (SM) no grupo criopreservado, enquanto ácidos graxos saturados e poli-insaturados (PUFAs) e lisofosfatidiletalamina (LPE) foram mais abundantes nas amostras in natura. A Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) demonstraram segregação significativa entre os espermatozoides in natura e criopreservado, sendo que as PC apresentaram maior VIP score para o grupo criopreservado na diferenciação dos tratamentos enquanto os ácidos graxos e LPC foram superiores no grupo controle. Os achados sugerem que a criopreservação induz alterações na composição e distribuição lipídica da membrana espermática, sugerindo a ocorrência de uma “crioinjúria”, diferente da capacitação espermática na qual esses eventos ocorrem de forma ordenada, culminando na ocorrência da reação acrossomal e permitindo a fertilização.

Palavras-chave: Espermatozoides, hiperativação, bovinos, perfil lipídico, reação acrossômica.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) auxílio à pesquisa regular (processo N°2023/01059-0), à Reprodux Laboratórios, Lipid Marker Omics Science e Alta Genetics Brasil.

Effects of bovine semen cryopreservation on sperm capacitation events and lipidomic profile

Alexandre da Rocha Bozzi^{1*}, Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹,
Fernanda Baatsch Nascimento¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Ellen Lara Miguel¹, Máira Bianchi
Rodrigues Alves², Raissa Braido Rangel², Daniel Silva Antonelo³, André Furugen Cesar de Andrade⁴,
Rubens Paes de Arruda⁵, Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹

¹Laboratory of Teaching and Research in Pathology of Reproduction, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ²Reproduction Biotechnology Laboratory, Department of Pathology, Reproduction and One Health, School of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, ³Lipid Marker Omics Science Ltda, Leme, São Paulo, Brasil, ⁴Laboratory of Andrology and Technology of Swine Embryos, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ⁵Laboratory of Semen Biotechnology and Andrology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil

*E-mail: celeghini@usp.br

Semen cryopreservation is an essential biotechnology for the broad application of artificial insemination in cattle, enabling the genetic dissemination of high-value bulls. However, this process induces significant structural and functional changes in spermatozoa, compromising their viability and fertilizing potential. This study aimed to investigate the effects of cryopreservation on sperm capacitation events and lipid profile alterations in spermatozoa from Nelore bulls. Three semen batches from 12 Nelore bulls (n = 36) were cryopreserved using an automated system (Tetakon, TK 3000 Plus®, Uberaba, MG, Brazil) and the Optidux extender (Reprodux Laboratórios Ltda, Itapira, SP, Brazil). Semen samples were analyzed before and after cryopreservation for motility parameters (CASA, Hamilton Thorne® software, IVOS II), capacitation events (flow cytometry, BD AccuriC6), and the sperm lipidome. Lipidomic evaluations were performed using multiple reaction monitoring (MRM-profiling) by the company Lipid Marker Omics Science Ltda. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, with a significance level set at 5%. Cryopreservation significantly impaired sperm functionality, with reductions observed in total motility (TM), progressive motility (PM), rapid cells (RAP), straight-line velocity (VSL), linearity (LIN) ($P < 0.0001$), and beat cross frequency (BCF) ($P = 0.01$). Regarding capacitation-related events, there was a significant increase ($P < 0.0001$) in membrane phospholipid disorder (Merocyanine-540), lipid peroxidation (C11-Bodipy 581/591), and cholesterol efflux (Bodipy-Cholesterol), as well as in phosphatidylserine translocation ($p = 0.01$, Annexin V). Despite the significant decrease in membrane integrity ($P < 0.0001$) and mitochondrial membrane potential (JC-1), cryopreservation did not impair the occurrence of the acrosome reaction (FITC-PSA), indicating that spermatozoa retained this functional capacity. Lipidomic analysis revealed compositional changes in the membrane, with increased abundance of carnitine conjugates (CAR), phosphatidylcholines (PC), diacylglycerols (DG), phosphatidylethanolamines (PE), and sphingomyelins (SM) in the cryopreserved group, whereas saturated and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and lysophosphatidylethanolamines (LPE) were more abundant in fresh samples. Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) demonstrated a clear segregation between fresh and cryopreserved spermatozoa. PCs had the highest VIP scores in the cryopreserved group, contributing most to treatment discrimination, while fatty acids and LPCs were more prominent in the control group. These findings suggest that cryopreservation induces alterations in the composition and distribution of lipids in the sperm membrane, indicative of a cryoinjury. This process differs from sperm capacitation, in which these events occur in a controlled and sequential manner, ultimately leading to the acrosome reaction and enabling fertilization.

Keywords: Spermatozoa, hyperactivation, cattle, lipid profile, acrosome reaction.

Acknowledgments: The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the regular research grant (process No. 2023/01059-0), Reprodux Laboratórios, Lipid Marker Omics Science, and Alta Genetics Brazil.

Comparação entre Touros Nelore e Holandeses quanto à Motilidade Espermática Pós-Descongelamento após Insulação Escrotal

Vitor Hugo Rodrigues Branco de Miranda¹; Thainá Sallum Bacco Manssur²; Renan Denadai^{2,3}; Larysse Aparecida Alves²; Marcos Gomides Carvalho²; Ramon Alves da Cunha²; Samuel Hermogenes Costa²; João Carlos Pinheiro Ferreira²

¹Departamento de cirurgia veterinária e reprodução animal, FMVZ - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: vitor.r.miranda@unesp.br

Nos bovinos, a temperatura testicular é mantida de 2 °C a 6 °C abaixo da temperatura corporal por meio de mecanismos orquestrados de troca de calor entre o animal e o meio ambiente. O aumento excessivo da temperatura ambiente pode comprometer essa capacidade termorreguladora e afetar negativamente a função reprodutiva dos touros, uma vez que o aquecimento testicular e epididimário compromete a qualidade espermática. Touros submetidos a um modelo de estresse térmico baseado na insulação escrotal (IE) apresentam redução na motilidade e concentração espermática, além de aumento no número de espermatozoides morfolologicamente anormais no ejaculado. Sabe-se que touros de origem europeia são mais sensíveis ao estresse térmico do que os de origem indiana. Portanto, nossa hipótese é que touros Nelore submetidos ao estresse térmico por IE apresentariam maior motilidade espermática e melhor congelabilidade seminal do que touros Holandeses. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da IE sobre a motilidade espermática pós-descongelamento e com o teste de termorrestencia (TTR) de touros *Bos indicus* e *Bos taurus*. Para isso, touros Nelore (n = 4) e Holandeses (n = 4), com aproximadamente 18 meses de idade previamente selecionados por exame andrológico e sem alterações patológicas no sêmen, foram submetidos à IE por 48 horas, utilizando fraldas geriátricas descartáveis. Coletas de sêmen por eletroejaculação foram realizadas cinco dias antes da IE (D-5) e, posteriormente, nos dias 7 (D7), 28 (D28), 49 (D49) e 63 (D63) após o início da IE. Os ejaculados foram diluídos em meio BotuBov® (Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil), avaliados por análise computadorizada da motilidade espermática (CASA; Hamilton-Thorne, versão 10 Ivos), ajustados para uma concentração de 120×10^6 espermatozoides/mL, envasados em palhetas de 0,25 mL e congelados conforme o protocolo do Centro de Reprodução Animal da FMVZ – UNESP. Para a análise dos efeitos do estresse térmico sobre a congelabilidade seminal, as amostras foram descongeladas em banho-maria (37 °C/30 s), avaliadas imediatamente após a descongelamento (M0) por CASA e, em seguida, submetidas ao (TTR; 37 °C). As amostras foram avaliadas a cada hora, durante cinco horas (M1, M2, M3, M4 e M5). Em cada avaliação, foi registrada a motilidade total (MT, %). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e, de acordo com a sua distribuição, os efeitos de raça foram avaliados por teste t de Student ou Mann-Whitney. De maneira geral, não houve efeito significativo da raça, exceto no D-5 em M4 (p = 0,0359), em que as médias de MT% foram de 21,25% para a raça Holandesa e 4,25% para a Nelore; e em M5 (p = 0,0469), com médias de 10,25% para Holandeses e 1,75% para nelores. No D7, em M0 (p = 0,049), a MT foi de 43,75% para Holandeses e 23,5% para nelores; e em M3 (p = 0,007), de 50,25% e 8,25%, respectivamente. Nesses momentos, os touros Holandeses apresentaram maior MT em relação aos nelores. Portanto, nossa hipótese não foi confirmada: touros Holandeses e Nelore submetidos ao estresse térmico por IE apresentaram motilidade espermática e resistência ao TTR pós-descongelamento similares, apesar de os primeiros serem sabidamente mais sensíveis ao estresse térmico ambiente. Este achado pode estar relacionado ao fato de ambos os grupos genéticos terem sido submetidos ao mesmo método de aquecimento escrotal e, portanto, às mesmas temperaturas testiculares e epididimárias. Isso sugere que a maior sensibilidade de touros Holandeses ao estresse térmico pode estar mais relacionada a uma menor capacidade termorregulatória escrotal do que a uma maior sensibilidade testicular e/ou epididimária. Com base nos dados deste estudo, conclui-se que touros *Bos indicus* e *Bos taurus* apresentam motilidade espermática e resistência ao TTR pós-descongelamento similares quando submetidos à insulação escrotal.

Palavras-chave: Criopreservação; motilidade espermática; estresse térmico; *Bos indicus*; *Bos taurus*.

Financiamento: FAPESP (Processo 020/15556-8); CAPES (Processo 001) e CAPES PRINT-Unesp. Agradecimentos à Botupharma pelo fornecimento do meio diluidor de criopreservação seminal.

Comparison between Nelore and Holstein bulls in terms of post-thaw sperm motility after scrotal insulation

Vitor Hugo Rodrigues Branco de Miranda¹; Thainá Sallum Bacco Manssur²; Renan Denadai^{2,3}; Larysse Aparecida Alves²; Marcos Gomides Carvalho²; Ramon Alves da Cunha²; Samuel Hermogenes Costa²; João Carlos Pinheiro Ferreira²

¹Departamento de cirurgia veterinária e reprodução animal, FMVZ - UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: vitor.r.miranda@unesp.br

In cattle, testicular temperature is maintained between 2 °C and 6 °C below body temperature using orchestrated heat exchange mechanisms between the animal and the environment. Excessive increases in environmental temperature can compromise this thermoregulatory capacity and negatively affect the reproductive function of bulls, since testicular and epididymal heating compromises sperm quality. Bulls subjected to a heat stress model based on scrotal insulation (SI) show a reduction in sperm motility and concentration, as well as an increase in the number of morphologically abnormal sperm in the ejaculate. It is known that bulls of European origin are more sensitive to heat stress than those of Indian origin. Therefore, we hypothesize that Nelore bulls subjected to heat stress by IE would have higher sperm motility and better seminal freezability than Holstein bulls. The present study aimed to evaluate the effects of heat stress on post-thaw sperm motility and the thermotolerance test (TTR) of *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls. To this end, Nelore (n = 4) and Holstein (n = 4) bulls aged approximately 18 months, previously selected by andrological examination and without pathological alterations in their semen, were subjected to EI for 48 hours using disposable geriatric diapers. Semen was collected by electroejaculation five days before EI (D-5) and then on days 7 (D7), 28 (D28), 49 (D49), and 63 (D63) after the start of EI. The ejaculates were diluted in BotuBov® medium (Botupharma®, Botucatu, SP, Brazil), assessed by computerized sperm motility analysis (CASA; Hamilton-Thorne, version 10 Ivos), adjusted to a concentration of 120×10^6 sperm/mL, filled into 0.25 mL straws and frozen according to the protocol of the Animal Reproduction Center at FMVZ - UNESP. To analyze the effects of thermal stress on seminal freezability, the samples were thawed in a water bath (37 °C/30 s), evaluated immediately after thawing (M0) by CASA, and then subjected to (TTR; 37 °C). The samples were assessed every five hours (M1, M2, M3, M4 and M5). Total motility (TM, %) was recorded at each evaluation. The data was subjected to the Shapiro-Wilk normality test and, according to its distribution, the breed effects were evaluated using Student's t-test or Mann-Whitney. In general, there was no significant effect of breed, except on D-5 at M4 (p = 0.0359), where the mean MV was 21.25% for the Holstein breed and 4.25% for the Nelore; and at M5 (p = 0.0469), with means of 10.25% for Holstein and 1.75% for Nelore. On D7, at M0 (p = 0.049), the MV was 43.75% for Holstein and 23.5% for Nelore; and at M3 (p = 0.007), 50.25% and 8.25%, respectively. At these times, Holstein bulls had higher MV than Nelore bulls. Therefore, our hypothesis was not confirmed: Holstein and Nelore bulls subjected to heat stress by IE showed similar sperm motility and resistance to post-thaw TTR, even though the former are known to be more sensitive to ambient heat stress. This finding may be related to the fact that both genetic groups were subjected to the same method of scrotal heating and, therefore, the same testicular and epididymal temperatures. This suggests that the greater sensitivity of Holstein bulls to heat stress may be more related to a lower scrotal thermoregulatory capacity than to greater testicular and/or epididymal sensitivity. Based on the data from this study, it can be concluded that *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls have similar sperm motility and resistance to post-thaw TTR when subjected to scrotal insulation.

Keywords: cryopreservation; spermatoc motility; heat stress; *Bos indicus*; *Bos taurus*.

Funding: São Paulo Research Foundation (FAPESP; Process #2020/15556-8), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES, Grant#001), CAPES PRINT-Unesp. Acknowledgments to Botupharma for providing the semen cryopreservation extender.

A contaminação bacteriana no sêmen criopreservado de bovinos interfere na produção *in vitro* de embriões?

Lilian Scalón Zancheta¹, Rubens Paes de Arruda², Adolfo Firmo Ferreira³, Ricardo Araújo Micai^{1,3}, Ana Clara Faquineli Cavalcante³, Thaeny Lawane Purificação Ribeiro¹, Renata Lançon^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia 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

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

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma das principais biotécnicas da reprodução utilizadas pelos criadores de bovinos por maximizar a quantidade de descendentes de animais considerados superiores geneticamente e acelerar o melhoramento genético de rebanhos, visando o aproveitamento de animais jovens e diminuindo o intervalo entre gerações. A contaminação bacteriana no sêmen criopreservado de bovinos pode influenciar na qualidade seminal e interferir negativamente nas taxas da PIVE. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar a influência da contaminação bacteriana no sêmen criopreservado de bovinos sob as características espermáticas (motilidade pós descongelamento, integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial) e sua influência nas taxas de PIVE (% de clivagem, % cultivo *in vitro*, % de blastocistos e % de blastocistos expandidos, % embriões grau 3). Para isso, foram utilizadas 6 (seis) partidas de sêmen, sendo 3 (três) com unidades formadoras de colônias (UFC) e 3 (três) sem UFC, ambas coletadas do mesmo touro para maior controle de variáveis. A motilidade foi avaliada pelo sistema de análise computadorizada da motilidade (CASA) e as integridades de membrana foram avaliadas por meio das sondas Iodeto de Propídio, Hoechst 33342, FITC-PSA e JC-1 sob microscopia de epifluorescência. A PIVE foi analisada em 5 (cinco) réplicas, sendo uma por dia, em cada réplica incluiu-se as 6 (seis) partidas de sêmen e um touro controle. Então, foi realizada a produção *in vitro* de embriões usando de 120 a 300 ovócitos em cada partida por réplica, totalizando 5.970 ovócitos. Foi realizado cultivo de bactérias em ágar sangue, ágar MacConkey e caldo BHI (Brain Heart Infusion) e a identificação das bactérias pelo VITEK 2 Compact. Enfim, os dados foram analisados quanto a homogeneidade das variâncias pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, o teste T foi utilizado para detectar diferenças significativas entre os grupos com UFC e sem UFC, considerando $P \leq 0,05$ como diferença significativa. 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 foi de 45,00% ($\pm 3,90$) e de 38,33% ($\pm 3,19$), a porcentagem de células com a membrana acrossomal íntegra foi de 77,83% ($\pm 3,63$) e 76,33% ($\pm 1,20$), a porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial foi de 45,33% ($\pm 3,63$) e de 38,50% ($\pm 3,32$) nos grupos com UFC e sem UFC, respectivamente. As bactérias identificadas foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus dysgalactiae* spp. *equisidimilis* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Em relação a produção *in vitro* de embriões, a porcentagem de clivagem foi de 55,66% ($\pm 3,51$) e de 55,66% ($\pm 6,08$), a porcentagem de cultivo *in vitro* (CIV) foi de 31,92% ($\pm 0,99$) e de 29,76% ($\pm 2,97$), a porcentagem de blastocisto foi de 17% ($\pm 2,00$) e de 16,33% ($\pm 4,04$), a porcentagem de blastocistos expandidos foi de 66,33 ($\pm 10,01$) e de 66,33% ($\pm 6,65$), a porcentagem de embriões grau 3 foi de 3,7% ($\pm 0,72$) e de 4,53 ($\pm 1,68$), a porcentagem total por CIV foi de 35,71% ($\pm 1,67$) e de 32,29% ($\pm 7,90$) no grupos com UFC e sem UFC, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Por fim, pode-se concluir que a contaminação bacteriana no sêmen não interferiu nos resultados da PIVE.

Palavras-chave: produção *in vitro* de embriões; bactérias no sêmen, blastocisto; clivagem; qualidade seminal.

Does bacterial contamination in the bovine cryopreserved semen interfere with the *in vitro* embryo production?

Lilian Scalon Zancheta¹, Rubens Paes de Arruda², Adolfo Firmo Ferreira³, Ricardo Araújo Micaí³, Ana Clara Faquineli Cavalcante³, Thaeny Lawane Purificação Ribeiro¹, Renata Lanconi^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia 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

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

In Vitro Embryo Production (IVEP) is one of the main reproduction biotechniques used by cattle breeders because it maximizes the number of offspring of animals considered genetically superior and accelerates the genetic improvement of herds, aiming at the use of young animals and reducing the interval between generations. Bacterial contamination in bovine cryopreserved semen can influence seminal quality and negatively interfere with IVEP rates. Thus, the objective of this work was to analyze the influence of bacterial contamination on bovine cryopreserved semen under sperm characteristics (post-thaw motility, plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential) and its influence on IVEP rates (% of cleavage, % *in vitro* culture, % of blastocysts and % of expanded blastocysts, % of grade 3 embryos). For this, 6 (six) semen straw were used, 3 (three) with colony-forming units (UFC) and 3 (three) without UFC, both collected from the same bull for greater control of variables. Motility was evaluated by the Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) and membrane integrity was evaluated by Propidium Iodide, Hoechst 33342, FITC-PSA and JC-1 probes under epifluorescence microscopy. IVEP was analyzed in 5 (five) replicates, one per day, in each replicate six (6) semen starts and a control bull were included. Then, *in vitro* embryo production was performed using 120 to 300 oocytes in each batch per replication, totaling 5,970 oocytes. The bacteria were cultured on blood agar, MacConkey agar and BHI (Brain Heart Infusion) broth they were identified by VITEK 2 Compact. Finally, the data were analyzed for the homogeneity of the variances using the Shapiro-Wilk test. Next, the T-test was used to detect significant differences between the groups with and without UFC, considering $P \leq 0,05$ as a significant difference. Motility was 51,93% ($\pm 3,23$) in the group with UFC and 54,63% ($\pm 5,35$) in the group without UFC. The concentration was $9,76 \times 10^9$ sperm/mL ($\pm 0,91$) in the UFC group and $10,80 \times 10^9$ sperm/mL ($\pm 1,05$) in the group without UFC. The percentage of cells with all intact membranes was 45,00% ($\pm 3,90$) in the group with UFC and 38,33% ($\pm 3,19$) in the group without UFC. The percentage of cells with only intact plasma membrane was 45,00% ($\pm 3,90$) and 38,33% ($\pm 3,19$), the percentage of cells with intact acrosomal membrane was 77,83% ($\pm 3,63$) and 76,33% ($\pm 1,20$), the percentage of cells with high mitochondrial membrane potential was 45,33% ($\pm 3,63$) and 38,50% ($\pm 3,32$) in the groups with UFC and without UFC, respectively. The bacteria identified were *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus dysgalactiae* spp. *equisidimilis* and *Stenotrophomonas maltophilia*. Regarding the *in vitro* embryo production, the percentage of cleavage was 55,66% ($\pm 3,51$) and 55,66% ($\pm 6,08$), the percentage of *in vitro* culture (CIV) was 31,92% ($\pm 0,99$) and 29,76% ($\pm 2,97$), the percentage of blastocysts was 17% ($\pm 2,00$) and 16,33% ($\pm 4,04$), the percentage of expanded blastocysts was 66,33 ($\pm 10,01$) and 66,33% ($\pm 6,65$), the percentage of grade 3 embryos was 3,7% ($\pm 0,72$) and 4,53 ($\pm 1,68$), the total percentage per CIV was 35,71% ($\pm 1,67$) and 32,29% ($\pm 7,90$) in the groups with UFC and without UFC, respectively. No statistically significant differences were found between the groups. Finally, it can be concluded that bacterial contamination in the semen did not interfere with the IVEP results.

Key-words: *in vitro* embryo production; semen with bacteria; blastocyst; cleavage; semen quality.

Expressão de microRNAs relacionados à responsividade à capacitação espermática em touros de alta e baixa fertilidade

Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Ana Laura Pasqualinotto¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves², Raissa Braido Rangel², Cibele Maria Prado Zinni³, Rubens Paes de Arruda⁴, Juliano Coelho da Silveira³, Manoel Francisco de Sá Filho⁵, Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ²Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil, ³Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento, Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ⁴Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil, ⁵Alta Genetics do Brasil, Uberaba, MG, Brazil
*E-mail: celeghin@usp.br

O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo e ocupa a segunda posição na produção global de carne bovina. Ademais, o mercado de genética bovina continua crescendo, impulsionado pelo aumento das exportações de sêmen. Desta forma, a qualidade do sêmen criopreservado é essencial para a fertilidade, e estudos indicam que as análises tradicionais podem ser subjetivas e insuficientes para prever a real capacidade fértil dos espermatozoides. A capacitação espermática, processo fundamental para a fertilização, envolve eventos bioquímicos para a reorganização da membrana plasmática e ativação das vias de sinalização, permitindo a interação com a zona pelúcida do ovócito. Recentemente, os microRNAs (miRNAs) foram identificados como reguladores importantes da fertilidade em touros, mas há poucos estudos sobre seu papel na resposta espermática à capacitação *in vitro*. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a relação entre a capacitação espermática e os perfis de miRNAs no sêmen de touros Nelore classificados como de alta e baixa fertilidade, buscando identificar miRNAs que possam servir como potenciais biomarcadores da fertilidade relacionada à capacitação espermática. Para tal, foram utilizadas partidas comerciais de sêmen de 10 touros de alta fertilidade (AF) e 8 touros de baixa fertilidade (BF). Primeiramente, todas as partidas dos touros AF e BF foram avaliadas quanto aos diferentes eventos da capacitação espermática (desorganização dos fosfolipídios da membrana, suscetibilidade da membrana plasmática à peroxidação lipídica, translocação de fosfatidilserina, efluxo de colesterol, reação acrossomal e potencial de membrana mitocondrial) e, com base na diferença antes e após a indução da capacitação espermática *in vitro*, os touros foram classificados como de alta (AtR) e baixa responsividade (BxR) à capacitação espermática. Dentro do grupo AF foram selecionados 5 touros de AtR (AFAtR, controle positivo) e dentro do grupo BF foram selecionados 4 touros BxR (BFBxR, grupo de baixa fertilidade relacionada à capacitação). Posteriormente, para os touros dos grupos AFAtR e BFBxR foi analisada a abundância de 31 miRNAs. Os dados foram analisados estatisticamente pelo software SAS (versão 9.3), aplicando ANOVA com significância de $P \leq 0,05$. Poucas diferenças significativas foram encontradas para os eventos da capacitação, sendo encontradas maiores porcentagens de translocação de fosfatidilserina no grupo AFAtR do que no BFBxR. Em relação à expressão dos miRNAs, nenhuma diferença estatística foi encontrada; no entanto, dos 31 miRNAs investigados, 12 (bta-miR-18a, -25, 125b, -129-5p, -132, -191, -200b, -320a, -335, -375, -574, -1246) foram relatados anteriormente como associados às características de qualidade e eventos de capacitação espermática e, diferentemente expressos em touros com alta e baixa fertilidade. Estudos indicam que esses miRNAs podem proteger os espermatozoides contra capacitação prematura e promover a capacitação no momento adequado. Assim, este estudo reforça que a resposta à capacitação espermática está associada à translocação da fosfatidilserina, além de sugerir o potencial dos miRNAs como biomarcadores promissores para avaliação da fertilidade em touros Nelore.

Palavras-chaves: espermatozoides, fosfatidilserina, reação acrossomal, criopreservação, RNAs

Agradecimentos: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processos 2020/14918-3 e 2023/01059-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processo 312510/2021-7) e Alta Genetics do Brasil.

Expression of microRNAs related to responsiveness to sperm capacitation in high and low bull fertility

Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Ana Laura Pasqualinotto¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves², Raissa Braido Rangel², Cibele Maria Prado Zinni³, Rubens Paes de Arruda⁴, Juliano Coelho da Silveira³, Manoel Francisco de Sá Filho⁵, Eneiva Carla Carvalho Celeghini^{1*}

¹Laboratory of Teaching and Research in Pathology of Reproduction, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ²Reproduction Biotechnology Laboratory, Department of Pathology, Reproduction and One Health, School of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, SP, Brazil, ³Laboratory of Molecular Morphophysiology and Development, Department of Veterinary Medicine, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ⁴Laboratory of Semen Biotechnology and Andrology, Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, ⁵Alta Genetics Brazil, Uberaba, MG, Brazil

*E-mail: celeghin@usp.br

Brazil has the second-largest commercial bovine herd in the world and is the second-largest producer of beef globally. Furthermore, the bovine genetics market continues to grow, driven by increased semen exports. The quality of cryopreserved semen is essential for fertility; however, studies indicate that traditional analyses may be subjective and insufficient to predict the actual fertile capacity of sperm. Sperm capacitation, a fundamental process for fertilization, involves biochemical events that reorganize the plasma membrane, activate signaling pathways, and facilitate interaction with the zona pellucida of the oocyte. Recently, microRNAs (miRNAs) have been identified as important regulators of fertility in bulls, but there are few studies on their role in sperm response to *in vitro* capacitation. In light of this, this study aimed to investigate the relationship between sperm capacitation and miRNA profiles in the semen of Nellore bulls classified as high and low fertility. The goal was to identify miRNAs that may serve as potential biomarkers of fertility related to sperm capacitation. For this purpose, commercial semen batches from 10 high fertility (HF) and 8 low fertility (LF) bulls were used. First, all batches from HF and LF bulls were evaluated for different sperm capacitation events (lipid membrane disorder, lipid peroxidation, phosphatidylserine translocation, acrosome reaction, and mitochondrial membrane potential) and, based on the difference before and after *in vitro* sperm capacitation induction, the bulls were classified as high (HrC) and low (LrC) responsive to sperm capacitation. Within the HF group, 5 HrC bulls were selected (HFHrC, positive control), and within the LF group, 4 LrC bulls were selected (LFLrC, low fertility group related to capacitation). Subsequently, for the bulls of the HFHrC and LFLrC groups, the abundance of 31 miRNAs was analyzed. The data were statistically analyzed by SAS software (version 9.3), applying ANOVA with a significance of $P \leq 0.05$. Few significant differences were found for the capacitation events, with higher percentages of phosphatidylserine translocation being found in the HFHrC group than in the LFLrC. Regarding the expression of miRNAs, no statistical difference was found; However, of the 31 miRNAs investigated, 12 (bta-miR-18a, -25, 125b, -129-5p, -132, -191, -200b, -320a, -335, -375, -574, -1246) were previously reported to be associated with sperm quality traits and sperm capacitation events and, differently expressed in bulls with high and low fertility. Studies indicate that these miRNAs can protect sperm against premature capacitation and promote capacitation at the appropriate time. Thus, this study reinforces that the response to sperm capacitation is associated with phosphatidylserine translocation, in addition to suggesting the potential of miRNAs as promising biomarkers for evaluating fertility in Nellore bulls.

Keywords: sperm, phosphatidylserine, acrosomal reaction, cryopreservation, RNAs

Acknowledgements: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processes 2020/14918-3 and 2023/01059-0), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq process 312510/2021-7) and Alta Genetics Brazil.

Sistemas silvipastoris atenuam gradientes térmicos escroto-testiculares em touros jovens sob condições tropicais

Giovanna Galhardo Ramos¹, Rubens Paes de Arruda¹, Gabriela Novais Azevedo², Joedson Dantas Gonçalves³, Alda Juliana Castro de Sousa⁴, Livia Ferreira Pinho⁴, Isabella Rio Feltrin¹, Verônica Schinaider do Amaral Pereira², Alexandre Rossetto Garcia^{2,4*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil. ²Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil. ³Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil. ⁴Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Castanhal, PA, Brasil.

*E-mail: alexandre.garcia@embrapa.br

A pecuária nos trópicos expõe os animais a altas temperaturas e radiação solar direta, podendo afetar sua homeostasia e termorregulação escroto-testicular. Sabe-se que nos touros a função gonadal normal depende da manutenção da temperatura testicular em até 6 °C abaixo da temperatura interna corpórea. Por sua vez, o uso dos sistemas silvipastoris com arborização planejada busca promover melhores condições microclimáticas aos animais criados a pasto por efeito do sombreamento natural. Assim, o objetivo do estudo foi comparar os gradientes térmicos escroto-testiculares apresentados por touros jovens criados em sistemas de produção não sombreado (NS) ou silvipastoril (SSP). Ambos os sistemas de produção eram compostos por 12 ha de *Urochloa brizantha* (cv BRS Piatã) para pastejo rotacionado intensivo, em região de clima tropical de altitude (21°57'42''S, 47°50'28''W). No SSP havia presença de componente arbóreo (*Eucalyptus urograndis*), com 84 árvores/ha, dispostas no sentido leste-oeste, com distanciamento de 30 metros entre linhas e 4 metros entre árvores, proporcionando área de sombreamento útil de 30%. A redução média da radiação fotossinteticamente ativa era de 42% em relação ao sistema NS. Foram utilizados 46 touros jovens, sendo 22 Nelore (*Bos indicus*) e 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*). Animais de ambas as raças foram alocados de maneira homogênea nos sistemas NS (8,6±0,1 meses; 201,5±5,1 kg PV) e SSP (8,6±0,1 meses; 199,7±4,2 kg PV). Os animais foram avaliados quanto a temperatura interna e de superfície mensalmente, por doze meses (8 aos 19 meses de idade). A temperatura retal (TR) foi aferida com termômetro clínico digital por via transretal. Imagens termográficas foram geradas com termocâmera digital (Testo 890-2 kit, Testo AG, Alemanha), equipada com detector de 640×480 pixels, lente de 42°×32° (15 mm), sensibilidade térmica <40 mK (<0,04 °C à temperatura ambiente), faixa de temperatura de -30 a 100 °C, na opção de foco manual. A emissividade adotada foi de 0,98. Os termogramas foram analisados em laboratório (IRSoft v.5.0, Testo AG, Alemanha), delimitando-se as regiões anatômicas de interesse com uso de polígonos e ferramenta à mão livre. Os dados foram analisados com uso do SAS (v. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, EUA) para efeitos de sistema de produção (NS e SSP) e tempo (idade, em meses) e interação Sistema*Idade. O nível de significância adotado foi de 5% (P≤0,05). Não houve interação (Sistema*Idade) para TR (P = 0,21), a qual foi influenciada apenas pelo sistema de produção (NS: 39,5±0,0 vs. SSP: 39,3±0,0; P = 0,03). Houve interação significativa (Sistema*Idade) para os gradientes TR – temperatura do polo testicular proximal (P = 0,01), com diferença aos 14 (NS: 4,6±0,2 vs. SSP: 3,9±0,2 °C), 15 (NS: 4,9±0,2 vs. SSP: 4,3±0,2 °C), 18 (NS: 4,9±0,2 vs. SSP: 4,4±0,2 °C) e 19 (NS: 4,8±0,2 vs. SSP: 4,0±0,1 °C) meses de idade, sendo os gradientes menores para animais em SSP. Do mesmo modo, houve interação (Sistema*Idade) para o gradiente de TR – temperatura do polo testicular distal (P = 0,05) com diferença aos 13 (NS: 5,5±0,3 vs. SSP: 4,6±0,2 °C) e 14 (NS: 6,0±0,2 vs. SSP: 5,5±0,2 °C), também com menores valores para animais do SSP. Houve interação (Sistema*Idade) para o gradiente TR – temperatura da cauda do epidídimo (P = 0,05) apresentando diferença aos 13 (NS: 6,6±0,4 vs. SSP: 5,6±0,2 °C), 14 (NS: 7,2±0,2 vs. SSP: 6,5±0,2 °C) e 18 (NS: 7,5±0,2 vs. SSP: 6,8±0,2 °C) meses, com os menores valores registrados nos animais do sistema SSP. Do mesmo modo, houve interação (Sistema*Idade) para o gradiente de TR – temperatura média escrotal (P = 0,01), com animais do SSP exibindo grandezas menores do que o NS aos 13 (NS: 4,9±0,3 vs. SSP: 4,3±0,2 °C), 14 (NS: 5,5±0,1 vs. SSP: 4,8±0,2 °C) e 19 (NS: 5,6±0,2 vs. SSP: 4,8±0,1 °C) meses de idade. Essa diferenciação térmica nas regiões anatômicas é essencial para garantir a espermatogênese adequada, promovendo maior resfriamento das regiões escroto-testiculares mais distais em relação ao corpo do animal, pelo sistema contracorrente proveniente do plexo pampiniforme. Em conclusão, quando mantidos em sistema silvipastoril, touros jovens apresentaram menores gradientes térmicos em relação aos animais do sistema não sombreado, independentemente da raça, indicando que esses animais, além de reter menos energia térmica oriunda do meio, também são menos desafiados quanto à necessidade de ativar mecanismos termorregulatórios para manutenção da temperatura escrotal.

Palavras-chave: Bovinos, termografia infravermelha, termorregulação, sistemas de produção, bem-estar.

Agradecimentos: À FAPESP (Processos 2021/04335-3 e 2019/04528-6), à Embrapa (Projeto 20.22.00.137.00.00), ao CNPq e INCT-Reprodução Animal (Processo 404513/2021-2) e à CAPES (Cód. Financ. 001) pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

Silvopastoral systems attenuate scrotal-testicular thermal gradients in young bulls under tropical conditions

Giovanna Galhardo Ramos¹, Rubens Paes de Arruda¹, Gabriela Novais Azevedo², Joedson Dantas Gonçalves³, Alda Juliana Castro de Sousa⁴, Livia Ferreira Pinho⁴, Isabella Rio Feltrin¹, Verônica Schinaider do Amaral Pereira², Alexandre Rossetto Garcia^{2,4*}

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil. ²Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa Southeastern Livestock, São Carlos, SP, Brazil. ³School of Agricultural and Veterinary Sciences, São Paulo State University, Jaboticabal, SP, Brazil. ⁴Institute of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, PA, Brazil

*e-mail: alexandre.garcia@embrapa.br

Livestock production in the tropics exposes animals to high temperatures and direct solar radiation, which can affect homeothermy and scrotal-testicular thermoregulation. It's known that normal gonadal function in bulls depends on maintaining the testicular temperature up to 6°C below the internal body temperature. In turn, the use of silvopastoral systems with planned afforestation aims to promote better microclimatic conditions for grazing animals through the effect of natural shading. Therefore, this study aimed to compare the scrotal-testicular thermal gradients exhibited by young bulls reared in unshaded (NS) or silvopastoral (SPS) production systems. Both production systems consisted of 12 ha of *Urochloa brizantha* (cv BRS Piatã) for intensive rotational grazing, in a tropical altitude region (21°57'42"S, 47°50'28"W). In the SPS, there was a tree component (*Eucalyptus urograndis*) with 84 trees/ha, arranged in an east-west direction, with 30 meters between rows and 4 meters between trees, providing a useful shaded area of 30%. The average reduction in photosynthetically active radiation was 42% compared to the NS system. Forty-six young bulls were used, 22 Nellore (*Bos indicus*) and 24 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*). Animals of both breeds were uniformly allocated to the NS (8.6±0.1 months; 201.5±5.1 kg BW) and SPS (8.6±0.1 months; 199.7±4.2 kg BW) systems. Animals were evaluated monthly for internal and surface temperatures for twelve months (8 to 19 months of age). Rectal temperature (RT) was measured transrectally using a digital clinical thermometer. Thermographic images were taken with a digital thermal camera (Testo 890-2 kit, Testo AG, Germany) equipped with a 640×480 pixel detector, 42°×32° lens (15 mm), thermal sensitivity <40 mK (<0.04 °C at room temperature), temperature range from -30 to 100 °C, with manual focus option. The adopted emissivity was 0.98. The thermograms were analyzed in the laboratory (IRSoft v.5.0, Testo AG, Germany) using polygons and a freehand tool to delineate the anatomical regions of interest. Data were analyzed using SAS (v. 9.2, SAS Institute Inc., Cary, USA) for the effects of production system (NS and SPS) and time (age, in months) and the interaction of System*Age. The significance level used was 5% (P≤0.05). There was no interaction (System*Age) for RT (P = 0.21), which was only influenced by the production system (NS: 39.5±0.0 vs. SPS: 39.3±0.0; P = 0.03). There was a significant interaction (System*Age) for the RT - proximal testicular pole temperature gradient (P = 0.01), with differences at 14 (NS: 4.6±0.2 vs. SPS: 3.9±0.2 °C), 15 (NS: 4.9±0.2 vs. SPS: 4.3±0.2 °C), 18 (NS: 4.9±0.2 vs. SPS: 4.4±0.2 °C) and 19 (NS: 4.8±0.2 vs. SPS: 4.0±0.1 °C) months of age, with smaller gradients in SPS animals. Similarly, there was an interaction (System*Age) for the RT-distal testicular pole temperature gradient (P = 0.05) with a difference at 13 (NS: 5.5±0.3 vs. SPS: 4.6±0.2 °C) and 14 (NS: 6.0±0.2 vs. SPS: 5.5±0.2 °C) months of age, also with lower values for SPS animals. There was an interaction (System*Age) for RT - temperature of the cauda epididymis gradient (P = 0.05) showing a difference at 13 (NS: 6.6±0.4 vs. SPS: 5.6±0.2 °C), 14 (NS: 7.2±0.2 vs. SPS: 6.5±0.2 °C) and 18 (NS: 7.5±0.2 vs. SPS: 6.8±0.2 °C) months, with the lowest values recorded in animals from the NS system. Similarly, there was an interaction (System*Age) for RT - mean scrotal temperature gradient (P = 0.01), with SPS animals having lower values than NS at 13 (NS: 4.9±0.3 vs. SPS: 4.3±0.2 °C), 14 (NS: 5.5±0.1 vs. SPS: 4.8±0.2 °C) and 19 (NS: 5.6±0.2 vs. SPS: 4.8±0.1 °C) months of age. This thermal differentiation in the anatomical regions is essential to ensure adequate spermatogenesis, promoting greater cooling of the scrotal-testicular regions more distal to the animal's body by the countercurrent system originating from the pampiniform plexus. In conclusion, young bulls kept in a silvopastoral system presented lower thermal gradients compared to animals in a non-shaded system, regardless of breed, indicating that these animals, in addition to retaining less thermal energy from the environment, are also less challenged regarding the need to activate thermoregulatory mechanisms to maintain scrotal temperature.

Keywords: Cattle, infrared thermography, thermoregulation, production systems, welfare.

Acknowledgements: The authors thank FAPESP (Processes 2021/04335-3 and 2019/04528-6), Embrapa (Project 20.22.00.137.00.00), CNPq INCT-Animal Reproduction (Process 404513/2021-2), and CAPES (Financial Code 001) for the financial support.

Efeito da administração de substância apaziguadora bovina (SAB) sobre a qualidade espermática de touros *Nelore*

Mariana Karla Francolino da Silva¹, Matheus Henrique Vargas de Oliveira², Guilherme Domingues de Abreu Alvarenga³, Osvaldo Alex de Sousa³, André Michel de Castilhos², Maria Carolina Carrera Zerbini², André Maciel Crespilho^{2,4}

¹Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP; ²Central Bela Vista, Botucatu/SP;

³Nutricorp, Campinas/SP; ⁴Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo/SP

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

O estresse pode afetar negativamente a função reprodutiva de touros, ocasionando efeitos deletérios para a qualidade espermática e, consequentemente, para a eficiência reprodutiva e produção comercial de sêmen. A substância apaziguadora bovina (SAB) representa um análogo sintético de feromônios naturais produzidos por fêmeas bovinas durante o período de amamentação, os quais têm efeito tranquilizante sobre bezerros. Substâncias apaziguadoras têm sido utilizadas como alternativas para melhorar a interação social e minimizar os efeitos do estresse em sistemas intensivos de produção, apresentando resultados positivos no que diz respeito a qualidade de carne, produção de leite e aumento do ganho de peso em sistemas de confinamento. No entanto, não há registros na literatura de estudos que avaliaram o efeito da SAB sobre a qualidade seminal de machos bovinos confinados. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da administração de substância apaziguadora bovina sobre a qualidade espermática de touros, testando-se a hipótese de que a administração de SAB pode melhorar a capacidade de adaptação de bovinos ao sistema de confinamento, resultando em efeitos positivos sobre a qualidade de sêmen. Para o estudo foram selecionados 160 touros da raça Nelore, hípidos, com peso e idade médios de $391,32 \pm 28$ kg e 18 meses, respectivamente, mantidos em baias coletivas (40 animais por baia) no Centro Tecnológico da Central Bela Vista (Botucatu, Brasil). Os animais foram divididos em 2 grupos: *Controle* – sem administração de SAB ($n = 80$); *SAB* – administração de 5ml de SAB (SecureCatle®, Nutricorp, Campinas, Brasil) na região da nuca de cada animal (pour on) no dia da entrada no confinamento ($n = 80$). Todos os animais passaram por duas coletas de sêmen, sendo a primeira para avaliação andrológica inicial e seleção dos reprodutores (D0) e final para mensuração dos efeitos do tratamento (D60). As coletas de sêmen foram conduzidas por eletroejaculação (Autojac v3® Neovet, Uberaba, Brasil) e os ejaculados recuperados foram avaliados no ato da coleta quanto ao volume (tubos graduados) e cinética (motilidade total [%], progressiva [%] e vigor espermático [0 a 5]) de forma subjetiva sob microscopia de luz. Aliquotas de sêmen foram fixadas em formol salino 2% para posterior avaliação morfológica em microscopia de contraste de fase. A concentração espermática foi obtida através de método espectrofotométrico (AccuRead® IMV Technologies, L'Aigle, França). Os dados gerados foram avaliados através do procedimento PROC MIXED (SAS Institute Inc®, Cary, Estados Unidos) e os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Não foram observadas diferenças entre os grupos para as variáveis motilidade total e progressiva, embora ligeira diferença tenha sido evidenciada para o vigor espermático (3,42 vs. 3,25, respectivamente para o grupo Controle e SAB; $P = 0,05$). Animais que receberam SAB apresentaram maior concentração espermática por ml (356,9 vs. 215,41 milhões/mL, respectivamente para SAB e controle; $P = 0,001$) e total (3007,71 vs. 1757,34 milhões/mL, respectivamente para SAB e controle; $P = 0,002$). Adicionalmente, o grupo SAB apresentou menor percentual de defeitos menores (5,34%) em comparação ao Controle (7,53%; $P = 0,01$). Não foi observado efeito do uso de SAB sobre a circunferência escrotal, volume do ejaculado e percentual de defeitos espermáticos maiores ($P > 0,05$). A melhora na qualidade do sêmen observada no presente estudo pode estar associada à redução do estresse e modulação do temperamento promovidos pela SAB, favorecendo o equilíbrio do eixo endócrino-reprodutivo e, consequentemente, favorecendo a espermatogênese. Conclui-se que o uso da substância apaziguadora bovina é capaz de promover aumento da concentração espermática e redução de defeitos espermáticos menores em touros *Bos indicus* manejados em sistema de confinamento, parâmetros essenciais para a industrialização de ejaculados de animais mantidos em Centrais de coleta e processamento de sêmen.

Palavras-chave: estresse, sêmen, concentração espermática, feromônio sintético, bovino.

Effect of the administration of an appeasing substance on sperm quality in *Nelore* bulls

Mariana Karla Francolino da Silva¹, Matheus Henrique Vargas de Oliveira², Guilherme Domingues de Abreu Alvarenga³, Osvaldo Alex de Sousa³, André Michel de Castilhos², Maria Carolina Carrera Zerbini², André Maciel Crespilho^{2,4}

¹Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP; ²Central Bela Vista, Botucatu/SP;

³Nutricorp, Campinas/SP; ⁴Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo/SP

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

Stress can negatively affect the reproductive function of bulls, causing deleterious effects on semen quality and, consequently, on reproductive efficiency and commercial semen production. The bovine appeasing pheromone (BAP) represents a synthetic analogue of natural pheromones produced by bovine females during the lactation period, which have a calming effect on calves. Appeasing substances have been used as alternatives to improve social interaction and minimize the effects of stress in intensive production systems, showing positive results regarding meat quality, milk production, and increased weight gain in feedlot systems. However, there are no records in the literature of studies that evaluated the effect of BAP on the semen quality of confined male cattle. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of bovine appeasing substance administration on the sperm quality of bulls, testing the hypothesis that BAP administration can improve the adaptability of cattle to confinement systems, resulting in positive effects on semen quality. For the study, 160 healthy *Nelore* bulls with average weight and age of 391.32 ± 28 kg and 18 months, respectively, were selected and kept in collective pens (40 animals per pen) at the Technological Center of Central Bela Vista (Botucatu, Brazil). The animals were divided into 2 groups: Control – without BAP administration ($n = 80$); BAP – administration of 5 mL of BAP (SecureCattle®, Nutricorp, Campinas, Brazil) on the nuchal region of each animal (pour on) on the day of entry into confinement; $n = 80$. All animals underwent two semen collections, the first for initial andrological evaluation and selection of the breeders (D0) and the final for measurement of treatment effects (D60). Semen collections were conducted by electroejaculation (Autojac v3® Neovet, Uberaba, Brazil), and the recovered ejaculates were evaluated at the time of collection for volume (graduated tubes) and kinetics (total motility [%], progressive motility [%], and sperm vigor [0 to 5]) subjectively under light microscopy. Semen aliquots were fixed in 2% buffered formalin for later morphological evaluation under phase-contrast microscopy. Sperm concentration was obtained through spectrophotometric method (AccuRead® IMV Technologies, L'Aigle, France). Data were analyzed using the PROC MIXED procedure (SAS Institute Inc®, Cary, United States) and results were considered significant when $P \leq 0.05$. No differences were observed between groups for total and progressive motility variables, although a slight difference was observed for sperm vigor (3.42 vs. 3.25, respectively for Control and BAP group; $P = 0.05$). Animals that received BAP showed higher sperm concentration per mL (356.9 vs. 215.41 million/mL, respectively for BAP and Control; $P = 0.001$) and total sperm count (3007.71 vs. 1757.34 million/mL, respectively for BAP and Control; $P = 0.002$). Additionally, the BAP group showed a lower percentage of minor defects (5.34%) compared to Control (7.53%; $P = 0.01$). No effect of BAP use was observed on scrotal circumference, ejaculate volume, and percentage of major sperm defects ($P > 0.05$). The improvement in semen quality observed in the present study may be associated with the reduction of stress and modulation of temperament promoted by BAP, favoring the balance of the endocrine-reproductive axis and, consequently, favoring spermatogenesis. It is concluded that the use of bovine appeasing substance can promote an increase in sperm concentration and a reduction in minor sperm defects in *Bos indicus* bulls managed in confinement systems, essential parameters for the industrialization of ejaculates from animals kept in semen collection and processing centers.

Keywords: stress, semen, sperm concentration, synthetic pheromone, bovine.

Árvore de decisão aplicada a classificação andrológica de touros usados em monta natural

Silvio André Isler¹, Érikliis Nogueira², Vanessa Aparecida de Moraes Weber¹, Felipe de Oliveira Pedro¹, Fabiana de Andrade Melo Sterza¹, Dauydisson Antonio Gonzalez Cordeiro³, Urbano Gomes Pinto de Abreu⁴

¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, MS, Brasil; ²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil;

³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; ⁴Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil

*E-mail: islersilvio@gmail.com

O estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer as características mais impactantes na classificação do Exame Andrológico (EA) de touros usados em monta natural, através da confecção de uma Árvore de Decisão. Utilizou-se um banco de dados de EA de 2308 touros com os seguintes atributos, Região (planalto ou pantanal), Raça (Nelore, Montana, Brangus, Canchim e Simental), Genótipo (Zebu, Composto e Europeu), Idade = $50,6 \pm 27,4$ meses, Classe de Idade, Consistência Testicular (Dura elástica, Levemente Flácida, Elástica, Flácida e Dura), Perímetro Escrotal = $34,5 \pm 3,58$ cm, Volume de Sêmen = $6,02 \pm 3,07$ ml, Turbilhonamento Espermático $2,82 \pm 1,29$, Motilidade Espermática $58,04 \pm 16,1$ %, Vigor Espermático $3,03 \pm 0,81$, Defeito de Acrossoma = $2,84 \pm 6,22$ %, Gota Citoplasmática Proximal = $1,60 \pm 4,60$ %, Defeito de Cabeça = $2,22 \pm 5,14$ %, Defeito de Peça Intermediária = $3,44 \pm 6,82$ %, Defeitos Maiores Totais = $20,0 \pm 16,9$ %, Gota Citoplasmática Distal = $0,84 \pm 2,60$ %, Cabeça Isolada Normal = $2,56 \pm 5,12$ %, Defeitos de Cauda = $5,92 \pm 8,86$ %, Defeitos Menores Totais = $9,31 \pm 10,6$ %, Defeitos Totais = $29,3 \pm 23,5$ % e Espermatozoides Normais Totais = $71,0 \pm 22,5$ %. Essa base de dados foi submetida ao algoritmo J48 que é uma implementação do algoritmo C4.5, com validação cruzada de 10 dobras, que gerou uma árvore de decisão identificando os atributos mais relevantes para a classificação dos touros, como Apto, Inapto ou Questionável. O Percentual de Espermatozoides Normais Totais ocupou a raiz da árvore, enquanto o Total de Defeitos Maiores e Motilidade ficaram num segundo nível. Vigor, Consistência Testicular, Perímetro Escrotal e Defeitos de Peça Intermediária, ficaram num terceiro nível. Concluímos que na classificação de touros através de EA, alguns fatores foram mais relevantes na conclusão do exame.

Palavras chave: Exame Andrológico.

Agradecimentos: À Coordenação de Apoio à Pesquisa e Educação Superior (CAPES) e a Fundação para o Desenvolvimento da Educação Ciência e Tecnologia de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/SECTEI. Processo 16/2016).

Decision tree applied on andrological classification of bulls used in natural breeding

Silvio André Isler¹, Érikliis Nogueira², Vanessa Aparecida de Moraes Weber¹, Felipe de Oliveira Pedro¹, Fabiana de Andrade Melo Sterza¹, Dauydisson Antonio Gonzalez Cordeiro³, Urbano Gomes Pinto de Abreu⁴

¹Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul State University, Aquidauana, MS, Brasil; ²Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; ³Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil; ⁴Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil

*E-mail: islersilvio@gmail.com

This study aimed to establish the features that are more impactful on the classification of the Breeding Soundness Evaluation (BSE) of bulls used in natural breeding, through the building of a Decision Tree. It was used a database of BSE of 2308 bulls, with following features, Region (Planalto or Pantanal), Breeds (Nelore, Montana, Brangus, Canchim and Simental), Genotypic (Zebu Cattle, Compost and European), Age = $50,6 \pm 27,4$ months, Class of Age, Testicular Consistence (Hard Elastic, Slightly Flaccid, Elastic, Flaccid and Hard), Scrotal Circumference = 34.5 ± 3.58 cm, Semen Volume = 6.02 ± 3.07 ml, Sperm Swirl 3.03 ± 0.81 , Sperm Motility = 58.04 ± 16.1 %, Sperm Vigor 3.03 ± 0.81 , Acrosome Defect = 2.84 ± 6.22 %, Proximal Cytoplasmic Drop = 1.60 ± 4.60 %, Head Defect = 2.22 ± 5.14 %, Midpiece Defect = 3.44 ± 6.82 %, Total Major Defects = 20.0 ± 16.9 %, Distal Cytoplasmic Drop = 0.84 ± 2.60 %, Normal Isolated Head = 2.56 ± 5.12 %, Tail Defect = 5.92 ± 8.86 %, Minor Total Defects = 9.31 ± 10.6 %, Total Defects = 29.3 ± 23.5 %, Total Normal Sperms = 71.0 ± 22.5 %. This database was submitted to the J48 algorithm, which implements the C4.5 algorithm. The cross-validation of 10 folders generated a decision tree that found the more relevant features for classifying bulls as Satisfactory, Unsatisfactory, and Questionable. The Percentage of Total Normal Sperm was at the condition of root level, while Total Major Defects and Sperm Motility were at a second level. Sperm Vigor, Testicular Consistency, Scrotal Circumference, and Midpiece Defect were at a third level. We concluded that in the classification of bulls through BSE, some features were more relevant than in the conclusion of the exams.

Keywords: Beeding Soundness Evaluation.

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

Taxa de fecundação e polispermia após o condicionamento de espermatozoides em meio FIV-gotas suplementado com diferentes concentrações de heparina durante a etapa de pré-FIV em bovinos

Maria Julia Aparecida Daniel¹, Victória Marques¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves¹

¹Grupo de Pesquisa em Andrologia e Biologia do Desenvolvimento (AndroEmbryo Lab) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, Brasil

*E-mail: maira.bianchi@unesp.br

In vitro, os espermatozoides não estabelecem contato com o trato reprodutivo da fêmea no momento que antecede a fecundação. Embora pouco explorado, esse período pode ser benéfico para o condicionamento das células espermáticas e preparo para o processo de capacitação. As glicosaminoglicanas (GAGs) são fatores ovidutais, que compõem o microambiente uterino-ovidutal, essenciais para a capacitação espermática, reação acrossomal e, portanto, condicionamento do espermatozoide para a fecundação. No modelo de fecundação *in vitro* (FIV) em bovinos, as GAGs são representadas pela heparina, sendo que o condicionamento prévio dos espermatozoides com meios contendo heparina poderia impactar positivamente as taxas de fecundação e de produção *in vitro* de embriões. No entanto, estudos anteriores do grupo têm demonstrado que o condicionamento prévio espermático em meios com alta quantidade de heparina (*i.e.*, 10 µg/mL) impacta a taxa de polispermia resultando em 19,6% de taxa de polispermia. Aqui, o objetivo foi avaliar as taxas de fecundação e de polispermia de zigotos produzidos *in vitro* com espermatozoides condicionados previamente à FIV, na etapa de pré-FIV, com meio FIV-gotas com diferentes concentrações de heparina para determinar o meio que resultasse em maior taxa de fecundação com menor taxa de polispermia. Para isso, foram obtidos Complexos Cumulus-Oócito (CCOs) de ovários bovinos provenientes de abatedouro. Os CCOs foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) por 22 a 24 horas. Após, espermatozoides obtidos de doses comerciais de sêmen de três touros da raça Nelore (*Bos indicus*) foram selecionados pelo gradiente de densidade de Percoll® (Sigma-Aldrich, MO, EUA). Após, 1 x 10⁶ espermatozoides/mL foram incubados nos meios: 1) FIV-gotas com 0 µg/mL de heparina (FIV-0H); 2) FIV-gotas com 5 µg/mL de heparina (FIV-5H); 3) FIV-gotas com 10 µg/mL de heparina (FIV-10H); e 4) Talp-Sperm. Por ter composição distinta do meio FIV-gotas e não possuir heparina, o meio Talp-Sperm foi utilizado como controle. A incubação da pré-FIV foi de 30 minutos a 38,5°C a 5% de CO₂. Ao término, os espermatozoides foram transferidos para microgotas de meio FIV-10H cobertas por óleo mineral contendo 20 a 25 CCOs. Ao final de 12 horas de coincubação dos espermatozoides com CCOs, os presumíveis zigotos foram fixados em paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos e, após, corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 durante 15 minutos. As estruturas foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Olympus IX70, Tóquio, Japão) com filtro de 330-385 nm e aumento de 400x, sendo classificadas em: não fecundadas, fecundadas ou polispérmicas. A mesma partida de sêmen de cada touro foi utilizada em duas replicatas de produção de embriões. Todas as partidas foram previamente testadas quanto às taxas de produção *in vitro* de embriões resultando em 22,3% de taxa de blastocisto. Os dados foram submetidos ao teste de frequência de qui-quadrado. A taxa de fecundação foi calculada pelo número de estruturas fecundadas sobre o total de estruturas, enquanto a taxa de polispermia foi calculada pelo número de zigotos polispérmicos sobre o total de zigotos fecundados. Foi utilizado o programa SAS (*Statistical Analysis System*; SAS OnDemand for Academics) e considerado o nível de significância de 5%. Os resultados mostraram que a taxa de fecundação apresentou tendência ($P=0,08$) em ser maior no grupo Talp-Sperm (24,35%; 47/193) em comparação aos demais grupos (FIV-0H: 21,43%, 45/210; FIV-5H: 14,14%, 27/191; FIV-10H: 20,64%, 45/218). Quanto à taxa de polispermia, não houve diferença ($P=0,50$), sendo que o grupo Talp-Sperm apresentou 12,77% (6/47), e os grupos FIV-0H, FIV-5H e FIV-10H apresentaram 15,56% (7/45), 18,52% (5/27) e 24,44% (11/45) de taxa de polispermia, respectivamente. Conclui-se que o condicionamento prévio dos espermatozoides em meios FIV-gotas com diferentes concentrações de heparina não impacta a taxa de fecundação. Nas condições do estudo, a adição de heparina aos meios não alterou as taxas de polispermia. No entanto, mais estudos são necessários para aprimorar os protocolos de pré-FIV e contribuir para a melhoria dos sistemas de produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: produção *in vitro* de embriões, zigoto, capacitação espermática, heparina, polispermia.

Agradecimentos: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2024/05440-3) e à PROPE-UNESP pelo auxílio à pesquisa 144/2024 PROPE-UNESP-IEPE-RC.

Fertilization and polyspermy rates following sperm conditioning in IVF medium supplemented with different heparin concentrations during pre-IVF step in cattle

Maria Julia Aparecida Daniel¹, Victória Marques¹, Máira Bianchi Rodrigues Alves¹

¹Research Group in Andrology and Developmental Biology (AndroEmbryo Lab) – São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, Brazil

*E-mail: maira.bianchi@unesp.br

In vitro, sperm do not maintain contact with the female reproductive tract in the moments preceding fertilization. Although poorly explored, this period before fertilization may be beneficial for sperm conditioning and preparation for the capacitation process. Glycosaminoglycans (GAGs) are oviductal factors that form part of the uterine-oviductal microenvironment, which is essential for sperm capacitation, acrosome reaction, and therefore, sperm conditioning for fertilization. In the bovine *in vitro* fertilization (IVF) model, GAGs are represented by heparin. Preconditioning sperm in medium supplemented with heparin may positively influence fertilization rates and *in vitro* embryo production. However, previous studies from our research group have shown that preconditioning sperm in medium containing high concentrations (*i.e.*, 10 µg/mL) of heparin impacts the polyspermy rate resulting in 19.6% of polyspermy rate. Here, the aim was to evaluate the fertilization and polyspermy rates in zygotes produced *in vitro* with sperm previously conditioned for IVF, in the pre-IVF step, in IVF medium supplemented with different heparin concentrations to determine which medium resulted in higher fertilization rates with lower polyspermy incidence. For this, Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) were obtained from ovaries collected at a slaughterhouse and subjected to *in vitro* maturation (IVM) for 22 to 24 hours. Afterwards, sperm obtained from commercial semen doses from three Nellore bulls (*Bos indicus*) were selected using the Percoll[®] density gradient (Sigma-Aldrich, MO, USA). A concentration of 1×10^6 sperm/mL was incubated in the following medium: 1) IVF medium with 0 µg/mL of heparin (IVF-0H); 2) IVF medium with 5 µg/mL of heparin (IVF-5H); 3) IVF medium with 10 µg/mL of heparin (IVF-10H); and 4) Talp-Sperm medium. As displaying a distinct composition from IVF medium and does not containing heparin, the TALP-Sperm medium was used as a control. The pre-IVF incubation was for 30 minutes at 38.5°C with 5% CO₂. Afterwards, sperm were transferred to microdrops of IVF-10H medium covered with mineral oil, each containing 20 to 25 COCs. Following 12 hours of sperm-COCs coincubation, the presumed zygotes were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 minutes, and stained with 10 µg/mL of Hoechst 33342 for 15 minutes. The structures were evaluated under a fluorescence microscope (Olympus IX70, Tokyo, Japan) with a 330-385 nm filter and 400x magnification, and classified as: unfertilized, fertilized, or polyspermic. The same semen batches were used in two replicates of embryo production, and all batches had been previously tested for *in vitro* embryo production showing a blastocyst rate of 22.3%. The data were analyzed using the chi-square test. Fertilization rate was calculated as the number of fertilized zygotes over the total number of structures, while the polyspermy rates was calculated as the number of polyspermic embryos over the total number of fertilized zygotes. The analysis was performed using the SAS software (Statistical Analysis System; SAS OnDemand), with a significance level of 5%. The results indicated that fertilization rate tended ($P=0.08$) to be higher in the Talp-Sperm group (24.35%, 47/193) compared to the other groups (IVF-0H: 21.43%, 45/210; IVF-5H: 14.14%, 27/191; IVF-10H: 20.64%, 45/218). Polyspermy rates did not differ ($P=0.50$), with the Talp-Sperm group showing 12.77% (6/47), and the IVF-0H, IVF-5H, and IVF-10H groups displaying 15.56% (7/45), 18.52% (5/27), and 24.44% (11/45), respectively. In conclusion, pre-incubation of sperm in IVF medium with different heparin concentrations did not affect the fertilization rate. Moreover, the addition of heparin to the medium had no impact on the polyspermy rates in this study. Further studies are needed to refine pre-IVF protocols and improve the production rates in IVF systems.

Keywords: *in vitro* embryo production, zygotes, sperm capacitation, heparin, polyspermy.

Acknowledgments: To the São Paulo Research Foundation (FAPESP, process 2024/05440-3) and to PROPe-UNESP for research support 144/2024 PROPE-UNESP-IEPE-RC.

Impacto da pré-FIV no desenvolvimento embrionário: diferentes protocolos de incubação espermática sobre as taxas de clivagem e de blastocistos em bovinos

Victória Marques¹, Marina Machado¹, Laís Engler¹, Maria Julia Aparecida Daniel¹,
Maíra Bianchi Rodrigues Alves^{*1}

¹Grupo de Pesquisa em Andrologia e Biologia do Desenvolvimento (AndroEmbryo Lab), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil

*E-mail: maira.bianchi@unesp.br

Embriões bovinos produzidos *in vitro* pela PIVE (produção *in vitro* de embriões) apresentam qualidade inferior aos embriões produzidos *in vivo*. *In vivo*, os espermatozoides passam por período de condicionamento prévio à fecundação para promover a capacitação espermática e modular o potencial fértil. Neste sentido, a pré-incubação dos espermatozoides antes da etapa de fecundação *in vitro* (FIV), denominada neste estudo como pré-FIV (P-FIV), surge como uma estratégia de condicionamento no modelo *in vitro*. Dependendo do protocolo adotado para esse condicionamento, a P-FIV pode favorecer o processo de capacitação espermática e melhorar a qualidade do embrião produzido *in vitro*. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da incubação de espermatozoides em diferentes protocolos de P-FIV sobre as taxas de clivagem e de blastocistos em bovinos. Para isso, complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) obtidos por aspiração de ovários provenientes de abatedouro foram maturados *in vitro* por um período de 22 a 24 horas. Em seguida, embriões foram produzidos utilizando espermatozoides de doses de sêmen criopreservado de cinco touros da raça Nelore (*Bos indicus*) selecionados por gradiente de Percoll® (45% e 90%) e incubados nos meios Talp-Sperm (mTalp: 4,2 mg/mL NaCl, 1,87 mg/mL KCl, 2,1 mg/mL NaHCO₃, 0,05 mg/mL NaH₂PO₄, 0,145 mg/mL CaCl₂H₂O, 0,08 mg/mL MgCl₂6H₂O, 6,5 mg/mL Hepes, suplementado com 5 mg/mL de glicose, 18,50 mL de lactato de sódio, 140 mg/mL de piruvato de sódio e 200 mg/mL de albumina sérica bovina) e FIV-gotas modificado (mFIV: estoque de Tyrode's-lactato suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 18 mM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1,8 µM de epinefrina e 6 mg/mL de albumina sérica bovina) compondo os protocolos de P-FIV. A P-FIV foi realizada a 38,5 °C em atmosfera com umidade saturada e 5% de CO₂ por 30 ou 60 minutos, sendo os seguintes grupos experimentais: (1) mTalp-30 (Espermatozoides em mTalp por 30 minutos); (2) mTalp-60 (Espermatozoides em mTalp por 60 minutos); (3) mFIV-30 (Espermatozoides em mFIV por 30 minutos); (4) mFIV-60 (Espermatozoides em mFIV por 60 minutos); (5) Controle (Espermatozoides sem P-FIV). No grupo controle, a produção de embriões foi realizada por co-incubação direta dos espermatozoides com os CCOs. Após a P-FIV, os espermatozoides de todos os grupos foram co-incubados com CCOs em meio mFIV suplementado com 10 µg/mL de heparina, por 16 a 18 horas. Os presumíveis zigotos foram cultivados em meio SOF (fluido sintético de oviduto) suplementado com aminoácidos, citrato e inositol e com 5 mg/mL albumina sérica bovina, 2,5% soro fetal bovino, 22 µg/mL de piruvato de sódio e 50 µg/mL gentamicina, até o dia 7 de desenvolvimento embrionário. Foram avaliadas a taxa de clivagem (96 hpi, horas pós-inseminação) e a taxa de blastocisto (168 hpi). Os dados foram analisados pelo teste de qui-quadrado utilizando o programa SAS (*Statistical Analysis System*), considerando os cinco grupos experimentais. O nível de significância adotado foi de 5%. A taxa de clivagem foi superior ($P=0,0011$) no grupo Controle (65,05%^a; 201/309) em comparação aos grupos mFIV-30 (54,59%^{bc}; 164/301), mFIV-60 (53,59%^{bc}; 155/289) e mTalp-60 (48,84%^c; 147/301). O grupo mTalp-30 (58,42%^{ab}; 177/303) apresentou taxa de clivagem semelhante ao grupo Controle, mFIV-30 e mFIV-60. A taxa de blastocisto diferiu entre os grupos ($P<0,0001$), sendo maior no grupo mTalp-30 (21,78%^a; 66/303) em relação aos grupos mFIV-30 (11,30%^b; 34/301), mFIV-60 (9,34%^b; 27/289) e mTalp-60 (3,65%^c; 11/303). A taxa de blastocisto do grupo Controle (19,09 %^a; 59/303) foi semelhante à do grupo mTalp-30. Conclui-se que o protocolo de P-FIV em meio Talp-Sperm por 30 minutos resulta em taxas de clivagem e blastocisto semelhantes às do grupo Controle (sem P-FIV). Assim, o protocolo com meio Talp-Sperm por 30 minutos destaca-se como a abordagem mais eficiente para a otimização da P-FIV. Esses achados contribuem para a compreensão dos mecanismos que regulam o potencial fértil dos espermatozoides e para o aprimoramento da biotécnica de PIVE.

Agradecimentos: Ao Programa de Excelência Acadêmica da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX-CAPEs) pela bolsa de estudos e à PROPE-UNESP pelo auxílio à pesquisa 144/2024 PROPE-UNESP-IEPE-RC.

Palavras-chave: Produção *in vitro* de embriões, embrião, espermatozoides, desenvolvimento embrionário, fecundação *in vitro*.

Impact of pre-IVF on embryonic development: different sperm incubation protocols on cleavage rate and blastocyst production in cattle

Victória Marques¹, Marina Machado¹, Laís Engler¹, Maria Julia Aparecida Daniel¹, Máira Bianchi Rodrigues Alves^{*1}

¹Grupo de Pesquisa em Andrologia e Biologia do Desenvolvimento (AndroEmbryo Lab, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil

^{*}E-mail: maira.bianchi@unesp.br

Embryos produced through *in vitro* embryo production (IVEP) exhibit lower quality compared to embryos developed *in vivo*. *In vivo*, sperm undergo a conditioning period prior to fertilization, which triggers capacitation and modulate fertilization potential. Within this context, sperm incubation prior to *in vitro* fertilization (IVF) step, referred to as pre-IVF, emerges as a strategy to mimic this conditioning *in vitro*. Depending on the protocol adopted, pre-IVF (P-IVF) may improve IVEP outcomes by enhancing embryo quality. Thus, herein, the aim was to assess the effects of different P-IVF sperm incubation protocols on the cleavage and blastocyst rates in cattle. For that, *cumulus*-oocyte complexes (COCs) obtained from the aspiration of slaughterhouse-derived ovaries were matured *in vitro* for 22 to 24 hours. Afterwards, cryopreserved semen straws from five Nellore bulls (*Bos indicus*) were processed using a Percoll® gradient (45% e 90%), and selected sperm were incubated in Talp-Sperm (mTalp: 4.2 mg/mL NaCl, 1.87 mg/mL KCl, 2.1 mg/mL NaHCO₃, 0.05 mg/mL NaH₂PO₄, 0.145 mg/mL CaCl₂·H₂O, 0.08 mg/mL MgCl₂·6H₂O, 6.5 mg/mL HEPES, supplemented with 5 mg/mL glucose, 18.5 mL sodium lactate, 140 mg/mL sodium pyruvate and 200 mg/mL bovine serum albumin) or modified IVF medium (mIVF: Tyrode's lactate stock supplemented with 50 µg/mL gentamicin, 0.2 mM sodium pyruvate, 18 mM penicillamine, 10 µM hypotaurine, 1.8 µM epinephrine and 6 mg/mL bovine serum albumin). P-IVF was performed at 38.5 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ for 30 or 60 minutes, according to the following experimental groups: (1) mTalp-30 (Sperm incubated in mTalp for 30 minutes); (2) mTalp-60 (Sperm incubated in mTalp for 60 minutes); (3) mFIV-30 (Sperm incubated in mFIV for 30 minutes); (4) mFIV-60 (Sperm incubated in mFIV for 60 minutes); and (5) Control (Sperm without P-IVF). In the Control group, embryo production was carried out by co-incubating sperm with COCs without undergoing the P-IVF step. Following P-IVF incubation, sperm were co-incubated with COCs in mIVF supplemented with 10 µg/mL heparin for 16 to 18 hours. Presumed zygotes were then cultured in SOF medium (Synthetic Oviduct Fluid supplemented with aminoacids, citrate and inositol and with 5 mg/mL bovine serum albumin, 2.5% FBS, 22 µg/mL sodium pyruvate and 50 µg/mL gentamicin) until day 7 of embryonic development in which the cleavage (96 hpi; hours post-insemination) and the blastocyst rates (168 hpi) were evaluated. Data were evaluated using chi-square test in SAS software (Statistical Analysis System), according to the five experimental group. Statistical significance was considered when P≤5%. Cleavage rate was higher (P=0.0011) in the Control group (65.05%^a; 201/309) compared to mIVF-30 (54.59%^{bc}; 164/301), mIVF-60 (53.59%^{bc}; 155/289) and mTalp-60 (48.84%^c; 147/301) groups. On the other hand, mTalp-30 group (58.42%^{ab}; 177/303) displayed a similar cleavage rate compared to Control, mIVF-30 and mIVF-60 groups. The blastocyst rate showed a difference (P<0.0001) between the groups in which the mTalp-30 group displayed a higher blastocyst rate (21.78%^a; 66/303) compared to the mFIV-30 (11.30%^b; 34/301), mFIV-60 (9.34%^b; 27/289) and mTalp-60 (3.65%^c; 11/303) groups. The blastocyst rate of the Control group (19.09%^a; 59/303) was similar to the blastocyst rate of the mTalp-30 group. In conclusion, the P-IVF protocol with Talp-Sperm for 30 minutes displays a similar cleavage and blastocyst rates to the Control group (With no P-IVF), standing out as the effective approach for the optimization of P-IVF. These findings open avenues to the comprehension of the mechanisms that determine sperm fertile potential and contribute to improving IVEP biotechnology.

Acknowledgment: To the Academic Excellence Program of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROEX-CAPES) for the fellowship and to PROPE-UNESP for the research grant 144/2024 PROPE-UNESP-IEPE-RC.

Keywords: In vitro embryo production, Embryo, Spermatozoa, Embryonic development, In vitro fertilization

Avaliação da viabilidade espermática de touros utilizando melatonina ao meio diluidor

Daniele Andressa Oliveira Sestari¹, Victor Alves dos Santos², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua³, André Maciel Crespilho⁴, Carlos Renato de Freitas Guaitolini⁵, Naia de Britto e Alves², Rosiara Rosária Dias Maziero Guaitolini^{2*}

¹Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, Paraná, Brasil; ²Centro Universitário Univel, Cascavel, Paraná, Brasil; ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Botucatu, São Paulo, Brasil; ⁴Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo, São Paulo, Brasil; ⁵CRV Lagoa, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

*E-mail: rosiaramaziero@gmail.com

A criopreservação espermática mostra-se como uma importante ferramenta para preservar e propagar a utilização do material genético de touros geneticamente superiores por tempo indeterminado. No entanto, após o processo de congelamento/descongelamento os espermatozoides sofrem danos irreversíveis, os quais comprometem a sua capacidade de fertilização, principalmente devido ao desequilíbrio no estado redox dos espermatozoides. Isto acontece pela alteração entre a oxidação/redução nos espermatozoides, levando ao estresse oxidativo (excesso de radicais livres, em relação aos antioxidantes no sêmen). Esse desequilíbrio pode danificar a estrutura e função dos espermatozoides, comprometendo a fertilidade. Neste sentido, a congelamento induz alterações na fluidez da membrana, as quais danificam as membranas mitocondriais, interrompendo seu potencial da membrana; e produzem quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio (EROS). O alto teor de ácidos graxos poli-insaturados presente nas membranas celulares dos espermatozoides predispõem à oxidação por EROS, e consequentemente o estresse oxidativo, manifestado pela peroxidação lipídica, danos ao DNA e apoptose. Visando o equilíbrio entre as defesas antioxidantes e a geração de EROS, a melatonina apresenta capacidade antioxidante, por eliminar íons hidroxila ($\cdot\text{OH}$), induzir a atividade e expressão de enzimas antioxidantes como glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase. Neste contexto, para avaliar o efeito da adição de melatonina ao meio diluidor (Botubov®, Botupharma Biotecnologia Animal), na cinética e viabilidade espermática em bovinos, foram utilizados 5 ejaculados, de 10 touros da raça Nelore ($n=50$), com idade média de 30 meses, submetidos a colheita de sêmen por eletroejaculação. Os ejaculados foram divididos em grupo controle (sem adição de melatonina), grupo M50: adição de 50 μM de Melatonina para 120 x 10⁶ espermatozoides/mL e grupo M100: adição de 100 μM de Melatonina para 120 x 10⁶ espermatozoides/mL. Após a descongelamento, avaliou-se a viabilidade espermática, quanto a integridade da membrana plasmática e acromossomal (IMPA) e a peroxidação lipídica nos momentos 0 e pós TTRR (teste de termorresistência rápido, 30 minutos/46°C), em citômetro de fluxo (BD FACSaria - Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). A integridade da membrana plasmática e acrossomal foi avaliada em combinação com a translocação de fosfatidilserina por iodeto de propídio (PI; P-4170), FITC-PSA (L-0770) e anexina V-APC (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA) e a peroxidação lipídica com o uso da sonda fluorescente C11-BODIPY® (D-3861; Molecular Probes Inc Eugene, Oregon, EUA) e iodeto de propídio (PI; P-4170). Os dados foram avaliados considerando os efeitos de tratamento (controle, M50 e M100), por análise de variância, seguido pelo teste de Tukey ($P<0,05$). Não foi observado efeito dos tratamentos, no parâmetro de IMPA, entre os grupos estudados ($P=0,7617$), com o grupo controle = $31,2 \pm 5,5$ %, grupo M50 = $31,9 \pm 3,8$ e grupo M100 = $30,8 \pm 5,2$ %. Já na avaliação de peroxidação lipídica, houve efeito dos tratamentos, no momento 0 h (M50 = $95,41 \pm 0,9$ %; M100 = $95,51 \pm 0,5$ %; $P=0,0256$) e após o TTR (M50 = $95,51 \pm 0,5$; M100 = $93,49 \pm 1,2$ %; $P=0,0294$), em relação ao grupo controle (0 h = $91,64 \pm 1,7$ %; TTR = $88,71 \pm 1,8$ %), com aumento da peroxidação lipídica nos grupos tratamentos. Dessa forma, concluiu-se que a utilização de melatonina nas concentrações de 50 μM e 100 μM adicionada ao diluidor de sêmen bovino, não interferiu na integridade da membrana plasmática e acrossomal, porém aumentou a peroxidação lipídica, dessa forma, nas condições deste estudo, não possuiu efeito antioxidante na criopreservação espermática em bovinos.

Palavras-chave: Bovinos, criopreservação espermática, viabilidade espermática, melatonina, peroxidação lipídica.

Evaluation of sperm viability in bulls using melatonin in the semen extender

Avaliação da viabilidade espermática de touros utilizando melatonina ao meio diluidor

Daniele Andressa Oliveira Sestari¹, Victor Alves dos Santos², Camila de Paula Freitas Dell'Aqua³, André Maciel Crespilho⁴, Carlos Renato de Freitas Guaitolini⁵, Naia de Britto e Alves², Rosiara Rosária Dias Maziero Guaitolini^{2*}

¹Universidade Paranaense (UNIPAR), Umuarama, Paraná, Brasil; ²Centro Universitário Univel, Cascavel, Paraná, Brasil; ³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Botucatu, São Paulo, Brasil; ⁴Universidade Santo Amaro (UNISA), São Paulo, São Paulo, Brasil; ⁵CRV Lagoa, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

*E-mail: rosiaramaziero@gmail.com

Sperm cryopreservation is a crucial tool for preserving and enabling the long-term use of genetic material from genetically superior bulls. However, the freeze-thaw process causes irreversible damage to spermatozoa, compromising their fertilization capacity. This is primarily due to oxidative stress resulting from a redox imbalance. Cryopreservation alters membrane fluidity, damages mitochondrial membranes, disrupts mitochondrial membrane potential, and leads to excessive production of reactive oxygen species (ROS). The high concentration of polyunsaturated fatty acids in sperm membranes makes them particularly vulnerable to ROS-induced oxidative damage, which manifests as lipid peroxidation, DNA fragmentation, and apoptosis. Melatonin, known for its antioxidant properties, scavenges hydroxyl radicals ($\bullet\text{OH}$) and enhances the activity and expression of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase, catalase, and superoxide dismutase. This study aimed to evaluate the effects of melatonin supplementation in the semen extender (Botubov®, Botupharma Biotecnologia Animal) on sperm kinetics and viability in cattle. A total of 50 ejaculates (5 per animal) were collected via electroejaculation from ten Nelore bulls (average age: 30 months). The samples were allocated into three experimental groups: Control (no melatonin), M50 (50 μM melatonin per 120×10^6 spermatozoa/mL), and M100 (100 μM melatonin per 120×10^6 spermatozoa/mL). After thawing, sperm viability was assessed by analyzing plasma and acrosomal membrane integrity (IMPA) and lipid peroxidation at 0 hours and post-thermoresistance test (TRR; 30 min at 46°C), using flow cytometry (BD FACSaria, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). IMPA and phosphatidylserine translocation were evaluated using propidium iodide (PI; P-4170), FITC-PSA (L-0770), and Annexin V-APC (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). Lipid peroxidation was measured using the C11-BODIPY® fluorescent probe (D-3861; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) combined with PI. Data were analyzed using ANOVA, followed by Tukey's post hoc test ($P < 0.05$). No significant differences were observed among the groups regarding IMPA ($P = 0.7617$), with values as follows: Control = $31.2 \pm 5.5\%$, M50 = $31.9 \pm 3.8\%$, and M100 = $30.8 \pm 5.2\%$. However, significant differences were found in lipid peroxidation at both time points. At 0 h, the M50 ($95.41 \pm 0.9\%$) and M100 ($95.51 \pm 0.5\%$) groups showed higher peroxidation compared to the control ($91.64 \pm 1.7\%$) ($P = 0.0256$). Following TRR, lipid peroxidation remained elevated in M50 ($95.51 \pm 0.5\%$) and M100 ($93.49 \pm 1.2\%$) relative to the control group ($88.71 \pm 1.8\%$) ($P = 0.0294$). In conclusion, under the conditions of this study, supplementation with 50 μM or 100 μM melatonin in the semen extender did not affect plasma or acrosomal membrane integrity. However, it increased lipid peroxidation levels, indicating that melatonin did not exert an antioxidant effect during bovine sperm cryopreservation.

Keywords: Bovine, sperm cryopreservation, sperm viability, melatonin, lipid peroxidation

Avaliação da Resistência Espermiática ao Congelamento em Touro Jovens da Raça Gir: Efeitos de Diferentes Diluidores e Métodos de Processamento

**Marcelo da Cunha Xavier^{1,2*}, Maurício Antônio Silva Peixer², Patrícia Furtado Malard², André Rabelo
Fernandes^{3,4}, João Henrique Moreira Viana⁵, Rosângela Vieira Andrade¹**

¹Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito federal; ²Biociências, Brasília, Distrito federal; ³Associação Brasileira de Criadores de Gir Leiteiro -ABCGIL, Uberaba, Minas Gerais; ⁴Faculdades de Uberaba – FAZU, Uberaba, Minas Gerais; ⁵Embrapa – Cenargen, Brasília, Distrito federal

*E-mail: marcelo@biocienciasanimal.com.br

A resistência dos espermatozoides ao congelamento depende de características da membrana, bem como a sua constituição, dos constituintes do plasma seminal e dos crioprotetores. O presente estudo teve como objetivo avaliar esta resistência em 48 touros jovens (até 36 meses) participantes do pré-teste de progênie da raça Gir, realizado em Uberaba - MG, comparando dois tipos de diluidores (Tris-Gema e Optixcell®) e dois métodos de processamento. Cada ejaculado foi dividido em quatro partes e diluído cada duas partes com um tipo de diluente, assim foram envasadas duas palhetas finas com uma das partes diluída com cada meio e as outras duas de cada meio foram centrifugadas (10 minutos a 600G). O pallet foi ressuspensão com o mesmo diluente da pré-diluição e em seguida envasado duas palhetas para cada diluente. A motilidade espermática pós-descongelamento foi realizada com lâmina e lamínula através do sistema CASA SpermVision, foi utilizada como critério de aprovação doses com a motilidade $\geq 30\%$. As motilidades progressivas obtidas médias, desvio padrão e o número de aprovados foram: Tris-Gema direto 23,59%, 16,27% e 31, Optixcell direto 18,85%, 16,37% e 20, Tris-Gema centrifugado (26,94%, 17,77% e 39) e Optixcell centrifugado (25,52%, 16,37% e 35). Estes resultados foram analisados por meio do teste de qui-quadrado. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os diluidores utilizados ($p = 0,24$), indicando que ambos proporcionam desempenho semelhante na criopreservação espermática. Por outro lado, a centrifugação prévia ao congelamento influenciou positivamente os resultados, com maior proporção de amostras aprovadas ($p = 0,0147$) quando comparada à diluição direta. Estes achados sugerem que a técnica de processamento exerce papel mais relevante que o tipo de diluidor na preservação da motilidade espermática em touros Gir jovens. Conclui-se que a centrifugação deve ser recomendada como prática rotineira para otimização dos protocolos de congelamento de sêmen nesta raça.

Palavras chaves: Sêmen Bovinos, congelabilidade e diluidores de sêmen

Evaluation of Sperm Resistance to Freezing in Young Gyr Bulls: Effects of Different Extenders and Processing Methods

Marcelo da Cunha Xavier^{1,2*}, Maurício Antônio Silva Peixer², Patrícia Furtado Malard², André Rabelo Fernandes^{3,4}, João Henrique Moreira Viana⁵, Rosangela Vieira Andrade¹

¹Universidade Católica de Brasília, Brasília, Distrito federal; ²Biotecnologia Animal, Brasília, Distrito federal;

³Associação Brasileira de Criadores de Gir Leiteiro -ABCGIL, Uberaba, Minas Gerais; ⁴Faculdades de Uberaba – FAZU, Uberaba, Minas Gerais; ⁵Embrapa – Cenargen, Brasília, Distrito federal

*marcelo@biotecnologiaanimal.com.br

The resistance of spermatozoa to freezing depends on the characteristics of the membrane, as well as its composition, the constituents of the seminal plasma and the cryoprotectants. The present study aimed to evaluate this resistance in 48 young bulls (up to 36 months old) participating in the pre-test of Gyr breed progeny, carried out in Uberaba - MG, comparing two types of extenders (Tris-Yolk and Optixcell®) and two processing methods. Each ejaculate was divided into four parts and each part was diluted in two parts with one type of extender. Two thin straws were then packaged with one of the parts diluted with each medium and the other two of each medium were centrifuged (10 minutes at 600G). The pellet was resuspended with the same diluent as the pre-dilution and then two straws were packaged with each diluent. Post-thaw sperm motility was measured using a slide and coverslip using the CASA SpermVision system. The approval criterion was doses with motility $\geq 30\%$. The progressive motilities obtained, means, standard deviation and number of approved were: direct Tris-Yolk 23.59%, 16.27% and 31, direct Optixcell 18.85%, 16.37% and 20, centrifuged Tris-Yolk (26.94%, 17.77% and 39) and centrifuged Optixcell (25.52%, 16.37% and 35). These results were analyzed using the chi-square test. There was no statistically significant difference between the extenders used ($p = 0.24$), indicating that both provided similar performance in sperm cryopreservation. On the other hand, centrifugation prior to freezing positively influenced the results, with a higher proportion of approved samples ($p = 0.0147$) when compared to direct dilution. These findings suggest that the processing technique plays a more relevant role than the type of extender in preserving sperm motility in young Gyr bulls. It is concluded that centrifugation should be recommended as a routine practice for optimizing semen freezing protocols in this breed.

Keywords: Bovine semen, freezeability and extenders