

Hemodinâmica testicular em touros jovens e sua relação com o perímetro escrotal

Lukas Gaudencio Bronoski¹, Denise Correia Silva¹, Giovana de Santi Phelippe Nunes¹, Anne Kemmer Souza¹,
Fábio Morotti¹, Flávio Antonio Barca Junior², Marcelo Marcondes Seneda^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA) – Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil; ²Laboratório de Imunogenética e Biologia Molecular – Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), Arapongas, Brasil.

*E-mail: marcelo.seneda@uel.br

Atualmente a utilização de touros em monta natural é a principal forma de reprodução em bovinos no Brasil, embora as biotecnologias reprodutivas estejam crescendo nos últimos anos. Para que a utilização dos touros ocorra com sucesso é imprescindível que esses animais estejam aptos à reprodução. Para a produção de espermatozoides viáveis acontecer é necessário uma série de fatores, entre eles a adequada termorregulação testicular, em especial nos locais com temperaturas desafiadoras a esses animais. O melhor entendimento dos mecanismos de termorregulação testicular é essencial para otimizar e possibilitar a utilização de touros em regiões de clima quente. Dessa forma, o presente estudo avaliou a hemodinâmica testicular de touros da raça Nelore com diferentes perímetros escrotais e com idade entre 14 e 18 meses e verificar as diferenças entre os grupos de maior e menor perímetro escrotal. O experimento foi realizado em Londrina – PR, com coletas mensais nos meses de janeiro a março de 2024. A amostra geral foi composta por 48 touros da raça Nelore, com idade entre 14 e 18 meses, dos quais foram estabelecidos, após medição do perímetro escrotal, dois grupos experimentais: G1 - composto pelos 12 animais com maior perímetro escrotal (média de $39,2 \pm 2,8$ cm); e, G2 – composto pelos 12 animais com menor perímetro escrotal (média de $29,6 \pm 2,9$ cm). Com auxílio da ultrassonografia Doppler pulsado foram coletadas as informações de velocidade média, velocidade de pico sistólico, velocidade de pico diastólico, índice de pulsatilidade e o índice de resistividade referente à artéria supra testicular para os grupos experimentais. Foi realizada também a correlação de Pearson entre as variáveis mensuradas. A velocidade média foi de $15,37 \pm 3,88$ cm/s, sendo maior nos animais com maior perímetro escrotal ($16,96 \pm 3,9$ cm/s) em comparação com os de menor perímetro ($13,78 \pm 3,1$ cm/s) ($p < 0,001$). A velocidade de pico sistólico também foi superior nos animais com maior perímetro escrotal ($21,9 \pm 5,1$ cm/s vs. $19,6 \pm 4,7$ cm/s, $p = 0,038$). Os índices de pulsatilidade e resistividade foram menores nos touros com maior perímetro escrotal ($0,45 \pm 0,18$ vs. $0,61 \pm 0,21$, $p < 0,001$; e $0,49 \pm 0,15$ vs. $0,57 \pm 0,13$, $p = 0,019$, respectivamente). Assim, através dos resultados foi possível observar diferenças dos parâmetros mensurados entre os dois grupos de animais (animais com maior perímetro e menor perímetro escrotal). Além disso, foi observada uma alta correlação positiva entre o perímetro escrotal e o fluxo sanguíneo testicular, indicando que touros com maior perímetro escrotal possuem melhor perfusão sanguínea testicular e potencialmente maior eficiência reprodutiva. Conclui-se que a ultrassonografia Doppler pulsado é uma ferramenta eficaz para avaliar a hemodinâmica testicular em touros Nelore jovens, demonstrando que animais com maior perímetro escrotal apresentam melhor perfusão sanguínea testicular, o que pode estar relacionado à maior eficiência na termorregulação e na produção espermática.

Palavras-chave: Bovino, testículo, circulação sanguínea, ultrassonografia Doppler.

Testicular hemodynamics in young bulls and its relationship with scrotal circumference

Lukas Gaudencio Bronoski¹, Denise Correia Silva¹, Giovana de Santi Phelippe Nunes¹, Anne Kemmer Souza¹, Fábio Morotti¹, Flávio Antonio Barca Junior², Marcelo Marcondes Seneda^{1*}

¹Laboratory of Biotechnology of Animal Reproduction Animal (REPROA) – State University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brazil; ²Laboratory of Immunogenetics and Molecular Biology – University of Northern Paraná (UNOPAR), Arapongas, Brazil

*E-mail: marcelo.seneda@uel.br

Currently, the use of bulls in natural mating is the primary method of reproduction in cattle in Brazil, although reproductive biotechnologies have been expanding in recent years. For the successful use of bulls, it is essential that these animals are reproductively fit. The production of viable spermatozoa requires a series of factors, including proper testicular thermoregulation, especially in regions with challenging temperatures for these animals. A better understanding of testicular thermoregulation mechanisms is crucial to optimizing and enabling the use of bulls in hot climates. Thus, the present study evaluated the testicular hemodynamics of Nelore bulls with different scrotal perimeters, aged between 14 and 18 months, to assess differences between groups with larger and smaller scrotal perimeters. The experiment was conducted in Londrina – PR, with monthly data collection from January to March 2024. The overall sample consisted of 48 Nelore bulls, aged between 14 and 18 months. Based on scrotal perimeter measurements, two experimental groups were established: G1 – composed of the 12 animals with the largest scrotal perimeter (mean of 39.2 ± 2.8 cm); and G2 – composed of the 12 animals with the smallest scrotal perimeter (mean of 29.6 ± 2.9 cm). Using pulsed Doppler ultrasonography, data were collected on mean velocity, peak systolic velocity, peak diastolic velocity, pulsatility index, and resistivity index of the suprastesticular artery for the experimental groups. Pearson correlation analysis was also performed among the measured variables. The mean velocity was 15.37 ± 3.88 cm/s, being higher in animals with a larger scrotal perimeter (16.96 ± 3.9 cm/s) compared to those with a smaller perimeter (13.78 ± 3.1 cm/s) ($p < 0.001$). Peak systolic velocity was also higher in animals with a larger scrotal perimeter (21.9 ± 5.1 cm/s vs. 19.6 ± 4.7 cm/s, $p = 0.038$). The pulsatility and resistivity indices were lower in bulls with a larger scrotal perimeter (0.45 ± 0.18 vs. 0.61 ± 0.21 , $p < 0.001$; and 0.49 ± 0.15 vs. 0.57 ± 0.13 , $p = 0.019$, respectively). The results revealed differences in the measured parameters between the two groups (animals with larger and smaller scrotal perimeters). Additionally, a high positive correlation was observed between scrotal perimeter and testicular blood flow, indicating that bulls with a larger scrotal perimeter have better testicular blood perfusion and potentially greater reproductive efficiency. It is concluded that pulsed Doppler ultrasonography is an effective tool for evaluating testicular hemodynamics in young Nelore bulls, demonstrating that animals with a larger scrotal perimeter exhibit better testicular blood perfusion, which may be related to improved thermoregulation and sperm production efficiency.

Keywords: Cattle, testicle, blood circulation, Doppler ultrasonography.

Desoxinivalenol e a toxicidade reprodutiva em camundongos pré-púberes: papel do estresse oxidativo

Ana Laura Paulino Leite Gomes¹; Juliana Rubira Gerez¹; Marielen de Souza¹; Camila Rodrigues Ferraz²; Waldiceu Aparecido Verri Junior²; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense¹

¹Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

²Laboratório de Dor, Inflamação, Neuropatia e Câncer, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

*E-mail: anapaula@uel.br

O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium*, que contamina aproximadamente 60% dos alimentos produzidos mundialmente. Essa toxina representa um fator de risco à saúde humana e animal, devido à sua ampla gama de efeitos tóxicos, incluindo o comprometimento reprodutivo em adultos de ambos os sexos. Embora a puberdade represente um processo fisiológico complexo e crucial para a reprodução e com diversas janelas críticas de vulnerabilidade à tóxicos, há raros estudos dos efeitos de DON em organismos pré-púberes. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo em camundongos machos pré-púberes expostos a essa micotoxina. Trinta camundongos pré-púberes (21 dias de idade) foram divididos em dois grupos: alimentado com ração contaminada (10 mg DON/kg), e dieta livre de micotoxinas. O período experimental durou 15 dias, após os quais os animais foram eutanasiados para a colheita dos testículos e epidídimos. O potencial antioxidante das amostras foi avaliado por espectrofotometria, por meio da mensuração da capacidade de redução de íons de ferro (FRAP) e do ensaio de eliminação de radicais livres (ABTS). Ainda, a produção de ânion superóxido foi determinada pela redução do corante NBT e a peroxidação lipídica, pela mensuração dos níveis de TBARS. Os dados foram verificados para os pressupostos de normalidade (Teste de Shapiro) e homogeneidade (Teste de Bartlett) e após, foram submetidos ao teste t de Student. Os animais expostos ao DON apresentaram diminuição significativa do potencial antioxidante nos testículos (FRAP: controle: $22,02 \pm 3,09$; DON: $16,80 \pm 4,09$; $p < 0,05$ | ABTS: controle: $95,98 \pm 10,11$; DON: $66,12 \pm 8,84$; $p < 0,01$) e epidídimos (FRAP: controle: $19,84 \pm 8,34$; DON: $11,44 \pm 1,56$; $p < 0,05$), bem como aumento significativo na produção do ânion superóxido nos testículos (NBT: controle: $1,24 \pm 0,35$; DON: $2,38 \pm 0,93$; $p < 0,05$). A peroxidação lipídica não apresentou alteração significativa nos órgãos reprodutivos dos camundongos pré-púberes expostos à micotoxina. As alterações no potencial antioxidante e aumento na produção do ânion superóxido sugerem que a exposição ao DON induz um desequilíbrio oxidativo em estágio inicial ou transitariamente compensado, no qual os sistemas antioxidantes celulares conseguem, por um período, limitar os danos às membranas lipídicas. Considerando a vulnerabilidade das células de Leydig ao estresse oxidativo e seu papel essencial na produção de testosterona, tais alterações podem comprometer o início da puberdade, e posteriormente, afetar a espermatogênese e a maturação espermática. Os achados deste estudo indicam que a exposição de animais pré-púberes ao DON compromete a capacidade antioxidante dos órgãos reprodutivos, representando um possível risco ao desenvolvimento puberal e à fertilidade futura. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para elucidar com mais precisão os efeitos do DON nesse período crítico do desenvolvimento e seus impactos a longo prazo.

Palavras-chaves: Vomitoxina; Puberdade; Reprodução; Antioxidantes.

Agradecimentos: A.L.P.L.G. recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo 88887.950779/2024-00. A.P.F.R.L.B. recebeu bolsa e financiamento de projeto do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 403843/2021-9.

Deoxynivalenol and reproductive toxicity in prepubertal mice: role of oxidative stress

Ana Laura Paulino Leite Gomes¹; Juliana Rubira Gerez¹; Marielen de Souza¹; Camila Rodrigues Ferraz²; Waldiceu Aparecido Verri Junior²; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense¹

¹Laboratory of Animal Pathology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

²Laboratory of Pain, Inflammation, Neuropathy and Cancer, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

*E-mail: anapaula@uel.br

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Fusarium*, which contaminates approximately 60% of the food produced worldwide. This toxin represents a risk factor for human and animal health due to its wide range of toxic effects, including reproductive impairment in adults of both sexes. Although puberty represents a complex physiological process that is crucial for reproduction and has several critical windows of vulnerability to toxins, there are few studies of the effects of DON in prepubertal organisms. Thus, this study aimed to evaluate oxidative stress in prepubertal male mice exposed to this mycotoxin. Thirty prepubertal mice (21 days old) were divided into two groups: fed contaminated chow (10 mg DON/kg) and mycotoxin-free diet. The experimental period lasted 15 days, after which the animals were euthanized for collection of the testes and epididymis. The antioxidant potential of the samples was evaluated by spectrophotometry, by measuring the iron ion reduction capacity (FRAP) and the free radical scavenging assay (ABTS). Furthermore, superoxide anion production was determined by the reduction of the NBT dye and lipid peroxidation by measuring the TBARS levels. The data were checked for the assumptions of normality (Shapiro test) and homogeneity (Bartlett test) and then submitted to the Student's t-test. Animals exposed to DON showed a significant decrease in antioxidant potential in the testes (FRAP: control: 22.02 ± 3.09 ; DON: 16.80 ± 4.09 ; $p < 0.05$ | ABTS: control: 95.98 ± 10.11 ; DON: 66.12 ± 8.84 ; $p < 0.01$) and epididymis (FRAP: control: 19.84 ± 8.34 ; DON: 11.44 ± 1.56 ; $p < 0.05$), as well as a significant increase in superoxide anion production in the testes (NBT: control: 1.24 ± 0.35 ; DON: 2.38 ± 0.93 ; $p < 0.05$). Lipid peroxidation did not show significant changes in the reproductive organs of prepubertal mice exposed to mycotoxin. The changes in antioxidant potential and increased superoxide anion production suggest that DON exposure induces an early or transiently compensated oxidative imbalance, in which cellular antioxidant systems are able to limit damage to lipid membranes for a period. Considering the vulnerability of Leydig cells to oxidative stress and their essential role in testosterone production, such changes may compromise the onset of puberty and subsequently affect spermatogenesis and sperm maturation. The findings of this study indicate that exposure of prepubertal animals to DON compromises the antioxidant capacity of reproductive organs, representing a possible risk to pubertal development and future fertility. However, further research is needed to elucidate more precisely the effects of DON in this critical period of development and its long-term impacts.

Keywords: Vomitoxin; Puberty; Reproduction; Antioxidants.

Acknowledgement: A.L.P.L.G. received a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 88887.950779/2024-00. A.P.F.R.L.B. received a fellowship and project funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 403843/2021-9.

Desoxinivalenol promove alterações testiculares e espermáticas em camundongos adultos

Ana Laura Paulino Leite Gomes¹; Juliana Rubira Gerez¹; Rafaela Pires Erthal²; Dayane Priscila dos Santos²; Glaura Scantamburlo Alves Fernandes²; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense¹

¹Laboratório de Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

²Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

*E-mail: anapaula@uel.br

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversos fungos, contaminando cerca de 60 a 80% das culturas alimentares. O desoxinivalenol (DON) é uma das micotoxinas com maior impacto econômico, afetando principalmente o sistema gastrointestinal e imune. Recentemente, a toxicidade reprodutiva do DON foi comprovada, porém poucos estudos avaliaram efeitos em machos. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do DON no testículo e sêmen de camundongos adultos (CEUA nº 27/2019). Trinta camundongos adultos (65 dias de idade) foram divididos em grupos: controle (ração livre de micotoxinas) e tratado (ração com 10 mg DON/kg de alimento). O experimento durou 15 dias e, após a eutanásia, os testículos foram fixados em Methacarn e congelados à -80 °C. Em seguida à eutanásia, os ductos deferentes foram retirados e lavados com solução salina formol; em esfregaços, os espermatozoides foram classificados quanto à normalidade (alterações: cabeça isolada, cabeça sem curvatura característica, cauda isolada, cauda quebrada ou cauda enrolada). Os testículos fixados foram processados por técnicas histológicas de rotina e corados com hematoxilina e eosina. Estas lâminas foram analisadas para parâmetros morfológicos (número de túbulos seminíferos anormais – presença de vacuolização citoplasmática no epitélio seminífero; células do epitélio seminífero na luz do túbulo seminífero; túbulos seminíferos degenerados com modificação do formato usual e/ou células acidófilas no epitélio seminífero) e morfométricos (diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio germinativo). Os testículos congelados foram homogeneizados e diluídos para a contagem de espermátides resistentes a homogeneização (ERH) (estágio 19 da espermatogênese). Assim, a produção diária espermática (PDE) resultou da divisão do número ERH por 4,84 (número de dias que uma espermátide madura permanece no epitélio seminífero). Os dados foram verificados com o Teste de Shapiro e o Teste de Bartlett e após, foram submetidos ao Teste t de Student ou Teste de Mann-Whitney. A análise histológica revelou que os animais alimentados com DON apresentaram aumento significativo de túbulos anormais (CTRL: $4,8 \pm 0,92$; DON: $9,8 \pm 2,11$; $p < 0,05$), além da redução significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos (CTRL: $135,90 [130,22 - 139,99]$; DON: $121,27 [109,80 - 129,69]$; $p < 0,001$) e da altura do epitélio germinativo (CTRL: $43,97 [40,8 - 52,44]$; DON: $42,90 [37,90 - 45,63]$; $p < 0,05$). Estes animais, ainda, exibiram redução significativa de 20% da PDE ($p < 0,01$) e aumento significativo de 31,37% na taxa de espermatozoides anormais ($p < 0,0001$). As principais anormalidades espermáticas foram cabeças sem curvatura característica e cauda quebrada. Os túbulos seminíferos são formados pelo epitélio germinativo, responsável pela espermatogênese, e pelas células de Sertoli, que fornecem suporte trófico ao processo. A redução do diâmetro dos túbulos seminíferos observada nos animais expostos ao DON pode ser atribuída à menor altura do epitélio germinativo. Consequentemente, essas alterações comprometem a morfologia tubular, a PDE e a qualidade morfológica dos espermatozoides, potencialmente reduzindo a capacidade reprodutiva dos animais. O DON, é uma micotoxina conhecida por induzir estresse ribotóxico, apoptose celular e estresse oxidativo, que podem estar diretamente envolvidos nas lesões observadas nos túbulos seminíferos. Os achados deste estudo indicam que a exposição de animais adultos ao DON afeta a morfologia e a morfometria testicular, além de prejudicar a PDE e a qualidade espermática, representando um risco à fertilidade. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos de ação do DON na toxicidade reprodutiva masculina.

Palavras-chaves: Vomitoxina; Reprodução; Testículo; Espermatozoides.

Agradecimentos: A.L.P.L.G. recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo 88887.950779/2024-00. A.P.F.R.L.B. recebeu bolsa e financiamento de projeto do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo 403843/2021-9.

Deoxynivalenol promotes testicular and sperm alterations in adult mice

Ana Laura Paulino Leite Gomes¹; Juliana Rubira Gerez¹; Rafaela Pires Erthal²; Dayane Priscila dos Santos²; Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes²; Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense¹

¹Laboratory of Animal Pathology, Department of Preventive Veterinary Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil

²Laboratory of Toxicology and Metabolic Disorders of Reproduction, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil.

*E-mail: anapaula@uel.br

Mycotoxins are secondary metabolites produced by several fungi, contaminating approximately 60 to 80% of food crops. Deoxynivalenol (DON) is one of the mycotoxins with the greatest economic impact, mainly affecting the gastrointestinal and immune systems. Recently, the reproductive toxicity of DON has been proven, but few studies have evaluated its effects in males. The objective of this study was to evaluate the impact of DON on the testis and semen of adult mice (CEUA No. 27/2019). Thirty adult mice (65 days old) were divided into groups: control (mycotoxin-free diet) and treated (diet with 10 mg DON/kg of food). The experiment lasted 15 days and, after euthanasia, the testicles were fixed in Methacarn and frozen at -80 °C. After euthanasia, the vas deferens were removed and washed with saline-formaldehyde solution; in smears, spermatozoa were classified according to normality (alterations: isolated head, head without characteristic curvature, isolated tail, broken tail or curled tail). The fixed testes were processed by routine histological techniques and stained with hematoxylin and eosin. These slides were analyzed for morphological parameters (number of abnormal seminiferous tubules – presence of cytoplasmic vacuolization in the seminiferous epithelium; seminiferous epithelial cells in the lumen of the seminiferous tubule; degenerated seminiferous tubules with modification of the usual shape and/or acidophilic cells in the seminiferous epithelium) and morphometric parameters (diameter of the seminiferous tubules and height of the germinal epithelium). The frozen testes were homogenized and diluted for counting homogenization-resistant spermatids (HRS) (stage 19 of spermatogenesis). Thus, the daily sperm production (DSP) resulted from dividing the HRS number by 4.84 (number of days that a mature spermatid remains in the seminiferous epithelium). The data were verified with the Shapiro Test and the Bartlett Test and then submitted to the Student's t-Test or Mann-Whitney Test. Histological analysis revealed that animals fed DON presented a significant increase in abnormal tubules (CTRL: 4.8 ± 0.92 ; DON: 9.8 ± 2.11 ; $p < 0.05$), in addition to a significant reduction in the diameter of the seminiferous tubules (CTRL: $135.90 [130.22 - 139.99]$; DON: $121.27 [109.80 - 129.69]$; $p < 0.001$) and in the height of the germinal epithelium (CTRL: $43.97 [40.8 - 52.44]$; DON: $42.90 [37.90 - 45.63]$; $p < 0.05$). These animals also exhibited a significant 20% reduction in PDE ($p < 0.01$) and a significant 31.37% increase in the rate of abnormal sperm ($p < 0.0001$). The main sperm abnormalities were heads without characteristic curvature and broken tails. The seminiferous tubules are formed by the germinal epithelium, responsible for spermatogenesis, and by Sertoli cells, which provide trophic support to the process. The reduction in the diameter of the seminiferous tubules observed in animals exposed to DON can be attributed to the lower height of the germinal epithelium. Consequently, these changes compromise the tubular morphology, PDE and morphological quality of sperm, potentially reducing the reproductive capacity of the animals. DON is a mycotoxin known to induce ribotoxic stress, cellular apoptosis and oxidative stress, which may be directly involved in the lesions observed in the seminiferous tubules. The findings of this study indicate that exposure of adult animals to DON affects testicular morphology and morphometry, in addition to impairing PDE and sperm quality, representing a risk to fertility. However, further studies are needed to clarify the mechanisms of action of DON in male reproductive toxicity.

Keywords: Vomitoxin; Reproduction; Testis; Sperm

Acknowledgement: A.L.P.L.G. received a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 88887.950779/2024-00. A.P.F.R.L.B. received a fellowship and project funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), grant number 403843/2021-9.

Ultrassonografia testicular de touros Nelore e sua correlação com a qualidade do sêmen**Charlene Karollaine de Castro Dourado^{1*}, Aline Pacheco¹, Ana Beatriz Fonseca de Oliveira¹, Kedson Alessandri Lobo Neves¹, Adria Fernanda Ferreira de Moraes¹, Letícia dos Santos Rebelo²**¹Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Santarém Pará²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: zoovetcharlene@gmail.com

Machos inférteis ou subférteis são uma fonte de perda econômica nos sistemas de produção de carne bovina. A seleção e o melhoramento genético dos reprodutores contribuem para melhorar e aumentar a produtividade e, consequentemente a lucratividade na criação de bovinos, por isso o uso de avaliações espermáticas e o uso de ferramentas como a ultrassonográfica são fundamentais para uma análise precisa da eficiência reprodutiva. Assim, este estudo avaliou a ultrassonográfica testicular de touros Nelore e sua correlação com a qualidade do sêmen. Foram utilizados 15 touros Nelore, divididos igualmente em três sistemas de criação, quais sejam, tradicional (ST) área sem sombreamento, silvipastoril (SP) área com disponibilidade de sombra, e integrado (SI) área com sombra e água (riacho). Foram realizadas coletas seminais em abril, maio e junho, totalizando três coletas por animal com intervalo de 30 dias cada uma e uma avaliação ultrassonográfica em junho, início do período menos chuvoso. Ao longo do experimento, observou-se um aumento progressivo nas condições microclimáticas com temperaturas variando de 24°C a 28°C e umidade relativa do ar 60% a 80% até final do experimento. Cada animal foi avaliado, por ultrassonografia, considerando o testículo direito e esquerdo. As análises seminais realizadas foram de volume, aspecto, motilidade progressiva, vigor, turbilhonamento concentração e morfologia espermática. Além das avaliações citadas, foi mensurado o perímetro escrotal com auxílio de fita métrica na posição mediana do saco escrotal, no ponto maior dimensão, envolvendo as duas gônadas e a pele escrotal. Para avaliação ultrassonográfica foi utilizado o aparelho ultrassom (Mindray DP50 Vet Power) com transdutor 5MHz, posteriormente as imagens foram transferidas para computador e analisadas por meio do software ImageJ (National Institutes of Health, Estados Unidos) onde foi avaliado intensidade/área dos pixels. Foram selecionadas seis áreas circulares em cada imagem para que posteriormente pudessem ser calculadas as médias na escala de cinza e encontradas a ecogenicidade de ambos os parênquimas – direito e esquerdo. As médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%. O procedimento de correlação CORR do SAS (Statistical Analysis System) foi para calcular as correlações simples entre as variáveis. Para os dados de ecogenicidade do parênquima testicular foram realizados os testes de normalidade de Shapiro-Wilk ($p < 0,0001$) e de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,01$). Os resultados indicam que o sistema de criação influenciou a qualidade seminal dos touros ($p < 0,05$). A ecogenicidade foi mais elevada ST, com médias de $80,75 \pm 31,54$ para o testículo direito e $75,42 \pm 30,41$ para o esquerdo. No SP, os valores foram de $61,37 \pm 13,07$ e $67,98 \pm 18,80$, respectivamente. Já no SI, observaram-se médias de $63,50 \pm 22,55$ para o testículo direito e $68,85 \pm 14,38$ para o esquerdo. Com relação às variáveis seminais, o ST apresentou menor motilidade espermática (66%), enquanto o SP (71%) e SI (73%). O SI se destacou na concentração espermática com $69,40 \pm 65,63$ em comparação ao ST que obteve $43,20 \pm 26,23$ e SI $40,40 \pm 43,00$. As correlações indicaram que a ecogenicidade testicular estava relacionada ao perímetro escrotal ($r = 0,311$) e com motilidade espermática ($r = 0,283$) ($p < 0,05$). Assim, sistemas de criação que ofereçam conforto térmico favorecem a qualidade espermática, contribuindo para melhor desempenho reprodutivo, especialmente em climas quentes como o da Amazônia, conforme observado no SP e SI.

Palavras-chave: Condições climáticas, ecogenicidade, sêmen, sistemas de criação, qualidade espermática.**Agradecimentos:** À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Testicular ultrasonography of Nelore bulls and its correlation with semen quality in the

Charlene Karollaine de Castro Dourado^{1*}, Aline Pacheco¹, Ana Beatriz Fonseca de Oliveira¹, Kedson Alessandri Lobo Neves¹, Adria Fernanda Ferreira de Moraes¹, Letícia dos Santos Rebelo²

¹Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Santarém Pará

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: zoovetcharlene@gmail.com

Infertile or subfertile males represent a source of economic loss in beef cattle production systems. The selection and genetic improvement of breeding bulls contribute to enhancing productivity and, consequently, the profitability of cattle farming. Therefore, semen evaluations and the use of diagnostic tools such as ultrasonography are essential for accurately analyzing reproductive efficiency. This study evaluated the testicular ultrasonography of Nelore bulls and its correlation with semen quality. Fifteen Nelore bulls were used, equally distributed among three management systems: traditional (ST) — area without shade, silvopastoral (SS) — area with available shade, and integrated (SI) — area with both shade and water (stream). Semen collections were performed in April, May, and June, totaling three collections per animal at 30-day intervals. Ultrasonographic evaluation was conducted in June, marking the beginning of the dry season. Throughout the experiment, a progressive increase in microclimatic conditions was observed, with temperatures ranging from 24°C to 28°C and relative humidity from 60% to 80%. Each animal underwent ultrasound evaluation of both the right and left testicles. Semen analyses included volume, appearance, progressive motility, vigor, swirl, concentration, and sperm morphology. In addition, scrotal circumference was measured using a measuring tape placed around the largest midpoint of the scrotum, encompassing both gonads and the scrotal skin. Ultrasonographic evaluation was performed using a Mindray DP50 Vet Power ultrasound device with a 5 MHz transducer. Images were transferred to a computer and analyzed using the ImageJ software (National Institutes of Health, USA), where pixel intensity/area was assessed. Six circular areas were selected from each image to calculate grayscale averages and determine testicular parenchyma echogenicity — right and left sides. Means were compared using Tukey's test at a 5% significance level. The CORR procedure of the SAS (Statistical Analysis System) software was used to calculate simple correlations between variables. Shapiro-Wilk ($p < 0.0001$) and Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.01$) tests were applied to assess the normality of echogenicity data. The results showed that the management system significantly influenced semen quality ($p < 0.05$). Echogenicity was highest in the ST group, with means of 80.75 ± 31.54 for the right testicle and 75.42 ± 30.41 for the left. The SS group presented values of 61.37 ± 13.07 and 67.98 ± 18.80 , respectively, while the SI group had averages of 63.50 ± 22.55 for the right and 68.85 ± 14.38 for the left testicle. Regarding semen variables, the ST group showed the lowest sperm motility 66%, while SS and SI presented 71% and 73%, respectively. The SS system also stood out in sperm concentration, with a mean of 69.40 ± 65.63 , compared to ST (43.20 ± 26.23) and SI (40.40 ± 43.00). Correlation analysis indicated that testicular echogenicity was related to scrotal circumference ($r = 0.311$) and sperm motility ($r = 0.283$) ($p < 0.05$). Thus, management systems that provide thermal comfort favor semen quality and contribute to better reproductive performance, especially in hot climates such as the Amazon, as observed in the SS and SI groups.

Keywords: Climatic conditions, echogenicity, semen, management systems, semen quality.

Acknowledgments: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Impacto da contaminação microbiana do sêmen na fertilidade de touros utilizados em IATF

Lorrainy Cristtyny de Souza Silva¹, Breno Henrique de Souza Silva¹, Marcelo Fagali², Eduardo Dos Santos Rossi² *

¹Discente - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil; ²Docente - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil

*E.mail: eduardorossi@professor.fae.edu.br

A discussão sobre espermocultura em reprodutores gera percepções relevantes sobre a presença de microrganismos no sêmen, podendo influenciar diretamente a eficiência reprodutiva. As bactérias ubíquas ou oportunistas, vírus e protozoários podem estar presentes no material seminal, agindo de forma isolada ou simbiótica, e são capazes de provocar distúrbios reprodutivos em touros. Neste trabalho, apresentam-se dados de campo que relacionam a qualidade microbiológica do sêmen com os índices de concepção em vacas leiteiras submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram avaliadas amostras de sêmen *in natura* de oito touros (1 Gir, 3 Jersey, 1 Girsey, 2 Nelore e 1 Holandês), utilizando os meios de cultura Ágar Sangue e MacConkey. Os métodos de colheita variaram entre vagina artificial e eletroejaculação, sendo todos os animais submetidos previamente à lavagem prepucial com solução fisiológica 0,9% e, um ejaculado de cada animal analisado. Entre os microrganismos isolados destacam-se *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, bacilos Gram-negativos (BGN), *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pasteurella spp.* e colônias hemolíticas (parte com pigmentação amarela). Dos oito animais submetidos a espermocultura, dois (1 Jersey e 1 Gir) foram utilizados na IATF, (ambos apresentando parâmetros espermáticos *in natura* mínimos, conforme CBRA, 2013), realizou-se a contagem de bactérias viáveis por superfície (CBVS), expressa em UFC/mL (cut-off para infecção: 10 UFC), no sêmen *in natura*. O touro da raça Jersey, com 5 mL de ejaculado coletado por vagina artificial, apresentou crescimento de colônias identificadas como *Staphylococcus spp.* (2 UFC/mL), *Micrococcus spp.* (1 UFC/mL) e *Pasteurella spp.* (61 UFC/mL). O touro da raça Gir, com 4 mL de ejaculado coletado por eletroejaculação, apresentou colônias de *Staphylococcus spp.* (1 UFC/mL) e *Streptococcus spp.*. Em relação ao *Streptococcus spp.*, observou-se crescimento excessivo de pequenas colônias, impossibilitando a quantificação precisa. Durante a IATF, utilizando sêmen *in natura* (30x10⁶ spz/palhetas de 0,5 mL), diluído em meio comercial (Botu-Bov[®]), as taxas de concepção (número de fêmeas gestantes pelo total de vacas inseminadas), independentemente do protocolo hormonal utilizado (três ou quatro manejos com os mesmos fármacos e dosagens), foram de 21% para o touro Jersey (n=30) e 50% para o touro Gir (n=32). Dessa forma, com base no isolamento qualitativo e na quantificação de UFC/mL dos microrganismos presentes nas amostras, observa-se uma possível relação entre a baixa taxa de concepção nas vacas inseminadas com sêmen do touro Jersey e a presença de *Pasteurella spp.*, microrganismo potencialmente patogênico. Em contraste, o sêmen do touro Gir apresentou apenas bactérias de natureza ubíqua, o que pode ter contribuído para o melhor desempenho reprodutivo. Os achados deste estudo ressaltam a importância da espermocultura como ferramenta complementar na avaliação da qualidade seminal, não apenas para fins de diagnóstico, mas também como estratégia de biossegurança, visando prevenir a disseminação de agentes infecciosos e minimizar perdas econômicas na reprodução animal.

Palavras-chave: Bovinos, Espermocultura, fertilidade.

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

Impact of microbial contamination of semen on the fertility of bulls used in IATF

Lorrainy Cristtyny de Souza Silva¹, Breno Henrique de Souza Silva¹, Marcelo Fagali², Eduardo Dos Santos Rossi^{2*}

¹Student - Faculty of Higher Education and Integral Training (FAEF), Garça, São Paulo, Brazil; ²Teacher - Faculty of Higher Education and Integral Training (FAEF), Garça, São Paulo, Brazil

*E-mail: eduardorossi@professor.fae.edu.br

The discussion on sperm culture in bulls generates relevant insights into the presence of microorganisms in semen, which may directly influence reproductive efficiency. Ubiquitous or opportunistic bacteria, viruses and protozoa may be present in seminal material, acting in isolation or symbiotically, and are capable of causing reproductive disorders in bulls. This paper presents field data relating the microbiological quality of semen to conception rates in dairy cows subjected to fixed-time artificial insemination (FTAI). Raw semen samples from eight bulls (1 Gir, 3 Jersey, 1 Girsey, 2 Nellore and 1 Holstein) were evaluated using Blood Agar and MacConkey culture media. Collection methods varied between artificial vagina and electroejaculation, with all animals previously subjected to preputial washing with 0.9% saline solution and one ejaculate from each animal analyzed. Among the microorganisms isolated, the following stand out: *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, Gram-negative bacilli (GNB), *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pasteurella spp.* and hemolytic colonies (part with yellow pigmentation). Of the eight animals subjected to sperm culture, two (1 Jersey and 1 Gir) were used in IATF (both presenting minimum *in natura* sperm parameters, according to CBRA, 2013). The viable bacteria per surface count (CBVS), expressed in CFU/mL (cut-off for infection: 10 CFU), was performed in the *in natura* semen. The Jersey bull, with 5 mL of ejaculate collected through an artificial vagina, showed growth of colonies identified as *Staphylococcus spp.* (2 CFU/mL), *Micrococcus spp.* (1 CFU/mL) and *Pasteurella spp.* (61 CFU/mL). The Gir bull, with 4 mL of ejaculate collected by electroejaculation, presented colonies of *Staphylococcus spp.* (1 CFU/mL) and *Streptococcus spp.*. Regarding *Streptococcus spp.*, excessive growth of small colonies was observed, making accurate quantification impossible. During IATF, using *in natura* semen (30x10⁶ spz/0.5 mL straw), diluted in commercial medium (Botu-Bov[®]), the conception rates (number of pregnant females per total number of cows inseminated), regardless of the hormonal protocol used (three or four managements with the same drugs and dosages), were 21% for the Jersey bull (n=30) and 50% for the Gir bull (n=32). Thus, based on the qualitative isolation and quantification of CFU/mL of the microorganisms present in the samples, a possible relationship was observed between the low conception rate in cows inseminated with Jersey bull semen and the presence of *Pasteurella spp.*, a potentially pathogenic microorganism. In contrast, the semen of the Gir bull presented only ubiquitous bacteria, which may have contributed to the better reproductive performance. The findings of this study highlight the importance of sperm culture as a complementary tool in the evaluation of seminal quality, not only for diagnostic purposes, but also as a biosafety strategy, aiming to prevent the spread of infectious agents and minimize economic losses in animal reproduction.

Keywords: Cattle, Sperm culture, fertility.

Acknowledgements: To the Faculty of Higher Education and Integral Training – FAEF, maintained by the Cultural and Educational Society of Garça for providing the animals and space for carrying out the research.

Efeito da supressão androgênica na pigmentação da pele em touro Nelore pós-orquiectomia

Emilse Megumi Fujimori¹, Eduardo dos Santos Rossi²

¹Discente - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil; ²Doscente - Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral (FAEF), Garça, São Paulo, Brasil*

*E-mail: eduardorossi@professor.faeff.edu.br

A testosterona é um hormônio esteroide pertencente ao grupo dos andrógenos, sendo sintetizado principalmente nas células de Leydig dos testículos em machos. Suas funções são amplamente reconhecidas no contexto da reprodução, como na espermatogênese, na manutenção da libido, no desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias e na expressão de características sexuais secundárias. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado a influência da testosterona sobre a pigmentação da pele e da pelagem em animais, especialmente aqueles de pelagem clara. Ainda, experimentos recentes constataram um aumento na produção de melanina, assim como nos níveis de testosterona durante as estações de inverno e primavera em bovinos Nelore alocados em pastagem não arborícola, fortalecendo a correlação positiva entre elas. Também, foi relatado a intensificação da cor do pelame conforme o aumento da idade desses animais, o que pode ter sido influenciado pela concentração de testosterona, que se eleve à medida que a idade avança. A coloração da pelagem é determinada, em grande parte, pela presença e distribuição da melanina, um pigmento produzido pelos melanócitos. A produção de melanina depende de diversos fatores, entre eles estímulos hormonais, sendo a testosterona um dos principais candidatos a modulador dessa expressão. Evidências apontam que a testosterona pode ativar melanócitos e estimular genes envolvidos na síntese de melanina, influenciando diretamente a cor da pelagem. A relação entre alterações hormonais e mudanças fenotípicas é pouco explorada na literatura veterinária, especialmente em relação à pigmentação em bovinos. Assim sendo, este relato descreve a alteração na coloração da pelagem de um touro Nelore de 16 anos, após orquiectomia bilateral terapêutica e ablação escrotal. Durante toda a vida adulta, o animal apresentava manchas de coloração escura em região dorso cervical e paleta, parte da barbeta, região distal de membros e escroto. A castração foi indicada devido à degeneração testicular unilateral, varicocele bilateral, formação de massas e comportamento sexual exacerbado. Após dois meses e meio da cirurgia, observou-se a substituição das manchas escuras por pelagem branca. Desse modo, com base nos estudos que investigaram a relação entre os níveis séricos de testosterona e o conteúdo de melanina no pelame de bovinos Nelore, conclui-se, com o presente relato, uma correlação positiva entre estas variáveis. Ademais, estas descobertas reforçam a importância da testosterona na melanogênese em touros, destacando sua influência não apenas na reprodução, mas também em características fenotípicas como a coloração do pelame.

Palavras-chave: testosterona; melanina; orquiectomia; pigmentação; touros Nelore.

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

Effect of Androgen Suppression on Skin Pigmentation in Nelore Bull Post-Orchiectomy

Emilse Megumi Fujimori¹, Eduardo dos Santos Rossi² *

¹Student - Faculty of Higher Education and Integral Training (FAEF), Garça, São Paulo, Brazil; ²Teacher - Faculty of Higher Education and Integral Training (FAEF), Garça, São Paulo, Brazil

*E-mail: eduardorossi@professor.fae.edu.br

Testosterone is a steroid hormone belonging to the group of androgens, being synthesized primarily in the Leydig cells of the testes in males. Its functions are widely recognized in the context of reproduction, such as in spermatogenesis, the maintenance of libido, the development of accessory sex glands, and the expression of secondary sexual characteristics. However, some studies have demonstrated the influence of testosterone on the pigmentation of skin and coat in animals, especially those with light-colored coats. Furthermore, recent experiments have found an increase in melanin production, as well as in testosterone levels during the winter and spring seasons in Nelore cattle kept in non-wooded pasture areas, strengthening the positive correlation between them. Additionally, the intensification of coat color as the age of these animals increases has been reported, which may have been influenced by the concentration of testosterone, which rises as age advances. Coat coloration is determined, to a great extent, by the presence and distribution of melanin, a pigment produced by melanocytes. Melanin production depends on several factors, including hormonal stimuli, with testosterone being one of the main candidates as a modulator of this expression. Evidence indicates that testosterone can activate melanocytes and stimulate genes involved in melanin synthesis, directly influencing coat color. The relationship between hormonal alterations and phenotypic changes is rarely explored in veterinary literature, particularly regarding pigmentation in cattle. Thus, this report describes the alteration in coat coloration of a 16-year-old Nelore bull after therapeutic bilateral orchiectomy and scrotal ablation. Throughout its adult life, the animal presented dark-colored spots in the dorsal cervical and shoulder blade region, part of the dewlap, the distal region of the limbs, and the scrotum. Castration was indicated due to unilateral testicular degeneration, bilateral varicocele, mass formation, and exacerbated sexual behavior. Two and a half months after the surgery, the dark spots were replaced by white coat coloration. Based on studies investigating the relationship between serum testosterone levels and melanin content in the coat of Nelore cattle, this report concludes a positive correlation between these variables. Moreover, these findings reinforce the importance of testosterone in melanogenesis in bulls, highlighting its influence not only in reproduction but also in phenotypic characteristics such as coat coloration.

Keywords: testosterone; melanin; orchiectomy; pigmentation; Nelore bulls.

Acknowledgments: We thank the Faculty of Higher Education and Integral Training – FAEF, maintained by the Cultural and Educational Society of Garça, for providing the animals and facilities used in this research.

Pigmentação escrotal não interfere na temperatura da superfície da pele do escroto

Heloisa Bortolozzo Silva^{1*}, Victor Hugo Gonçalves Galdioli¹, Lukas Gaudencio Bronoski¹, Flávio Antônio Barca Júnior², Aron Goulart Doretto¹, Jullia Beatriz de Lima Santos¹, Marcos Antônio Ribeiro de Lima Paulo¹, Fábio Morotti¹, Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA) – Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, Paraná, Brasil; ²Curso de Medicina Veterinária UNOPAR/Anhanguera, Arapongas, Paraná, Brasil

*E-mail: heloisa.bortolozzo@uel.br

A pele é o maior órgão do corpo e o principal elemento no controle da troca de calor do indivíduo com o meio. Os termorreceptores presentes na pele possuem papel fundamental nesse controle termorregulatório e também na sensação relativa ao calor. A absorção dos raios solares através da pele é influenciada pela sua coloração, sendo que a pigmentação cutânea pode afetar a termorregulação, a fotoproteção contra a radiação ultravioleta (UV) e também a sensibilidade cutânea à dor. De modo geral, tons de pele mais escura conferem maior proteção contra os danos ocasionados pela radiação UV; entretanto, estudos realizados em humanos e camundongos indicam que indivíduos com pele mais escura podem apresentar maior sensibilidade ao calor. Ainda, há diferença na sensibilidade da pele segundo a região do corpo, embora essa diferença seja minimizada se a radiação de exposição ao corpo for mais intensa. Além disso, diferenças genéticas ou adaptativas podem interferir, uma vez que o número de glândulas sudoríparas pode ser diferente entre os grupos genéticos distintos mesmo havendo pouca variação desses indivíduos quanto à genética e às diferentes colorações de pele. A espermatogênese depende do funcionamento adequado dos testículos, especialmente no que se refere à termorregulação testicular, pois a produção de espermatozoides deve ocorrer a uma temperatura de 4 a 6 °C inferior à temperatura corporal. Nesse contexto, diversos mecanismos relacionados à pele escrotal, ao sistema contracorrente da artéria testicular e o plexo pampiniforme e ao músculo cremáster podem contribuir para esse processo. Com relação à pele, destacam-se sua fina espessura, a menor quantidade de pelos e de gordura subcutânea, a alta densidade de glândulas sudoríparas no escroto e a ação da túnica dartos, que altera a área de superfície escrotal, e juntamente com o músculo cremáster, podem proporcionar uma maior ou menor aproximação dos testículos ao abdômen. A temperatura superficial da pele tem sido utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico e como preditora do estado de saúde dos animais, inclusive na avaliação testicular de touros. Considerando o importante papel da pele na manutenção adequada da temperatura testicular, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a temperatura da superfície da pele (TSP), segundo a pigmentação do escroto do animal. O estudo foi realizado com 40 tourinhos da raça Nelore, com idades entre 14 e 18 meses na data da avaliação, apresentando uma média de idade de 16 meses, criados em condições semi-extensivas e considerados clinicamente saudáveis e sem alterações no escroto no momento da avaliação. Para a aferição da TSP, os animais foram contidos em posição quadrupedal em troncos específicos para bovinos, sem a necessidade de sedação ou tranquilização e com o auxílio de um termômetro infravermelho (Easy Sensor, G-Tech ®); posicionado a 5 cm da pele na região mais larga do escroto, a temperatura da superfície da pele foi aferida. Dos 40 animais avaliados, 28 apresentavam escroto não pigmentado e 12 pigmentado (mais de 50% do escroto com pigmentação escura/preta) e os dados obtidos foram analisados por ANOVA após a verificação dos pressupostos necessários. O nível de significância utilizado foi de 5%. Os animais com escroto pigmentado apresentaram média de TSP de 36,1°C com desvio padrão de 0,2°C, já os animais não pigmentados apresentaram média de 36,2°C e desvio padrão de 0,18°C, não havendo, diferença significativa entre os grupos de escroto pigmentado ou não. Tal fato pode ser justificado pela disposição anatômica dos testículos na espécie bovina, os quais, por serem pendulares e situarem-se na região inguinal, permanecem relativamente protegidos da radiação solar direta, uma vez que a conformação corporal do próprio animal proporciona sombreamento natural, sobretudo durante os períodos de maior incidência solar. Somado a isso, essa condição anatômica do escroto nos bovinos também proporciona uma maior área de contato de superfície do escroto com o meio ambiente, o que favorece a dissipação de calor. Desta forma, a diferença na pigmentação do escroto não proporcionou alterações na temperatura da superfície da pele do escroto em touros da raça Nelore entre 14 e 18 meses.

Palavras-chave: Nelore, Termorregulação testicular, Touro.

Scrotal pigmentation does not affect scrotal skin surface temperature

Heloisa Bortolozzo Silva^{1*}, Victor Hugo Gonçalves Galdioli¹, Lukas Gaudencio Bronoski¹, Flávio Antônio Barca Júnior², Aron Goulart Doretto¹, Jullia Beatriz de Lima Santos¹, Marcos Antônio Ribeiro de Lima Paulo¹, Fábio Morotti¹, Marcelo Marcondes Seneda¹

¹Animal Reproduction Biotechnology Laboratory (ReproA) – State University of Londrina (UEL), Londrina, Parana, Brazil;

²Veterinary Medicine Program, UNOPAR/Anhaguera, Arapongas, Parana, Brazil

*E-mail: heloisa.bortolozzo@uel.br

The skin is the largest organ of the body and the main element in controlling heat exchange between the individual and the environment. Thermoreceptors in the skin play a fundamental role in thermoregulatory control and in the perception of heat. The absorption of solar radiation through the skin is influenced by its coloration; skin pigmentation can affect thermoregulation, photoprotection against ultraviolet (UV) radiation, and cutaneous sensitivity to pain. Generally, darker skin tones offer greater protection against UV radiation damage; however, studies conducted on humans and mice indicate that individuals with darker skin may be more sensitive to heat. Additionally, skin sensitivity varies depending on the region of the body, although this difference may be minimized if exposure to radiation is more intense. Genetic or adaptive differences may also play a role, as the number of sweat glands can vary between different genetic groups, even when individuals show little variation in genetics or skin color. Spermatogenesis depends on the proper functioning of the testes, particularly in terms of testicular thermoregulation, since sperm production must occur at a temperature 4 to 6°C lower than core body temperature. In this context, various mechanisms involving the scrotal skin, the countercurrent system of the testicular artery and pampiniform plexus, and the cremaster muscle contribute to this process. Regarding the skin, its thinness, lower density of hair and subcutaneous fat, high concentration of sweat glands in the scrotum, and the action of the dartos tunic which alters the scrotal surface area and, together with the cremaster muscle, regulates the proximity of the testes to the abdomen are highlighted. Skin surface temperature (SST) has been used as an auxiliary diagnostic tool and as a health indicator in animals, including in the evaluation of testicular function in bulls. Considering the important role of the skin in maintaining proper testicular temperature, the aim of this study was to evaluate skin surface temperature (SST) according to the pigmentation of the scrotum. The study was conducted with 40 young Nelore bulls, aged between 14 and 18 months at the time of evaluation, with an average age of 16 months, raised in semi-extensive systems, and clinically healthy with no scrotal alterations during the assessment. To measure SST, the animals were restrained in a standing position in specific cattle chutes, without the need for sedation or tranquilization, using an infrared thermometer (Easy Sensor, G-Tech®) placed 5 cm from the widest area of the scrotum to record skin surface temperature. Of the 40 animals evaluated, 28 had non-pigmented scrotums and 12 had pigmented scrotums (more than 50% of the scrotum with dark/black pigmentation). Data were analyzed using ANOVA after verifying necessary assumptions, with a significance level of 5%. Bulls with pigmented scrotums had an average SST of 36.1°C with a standard deviation of 0.2°C, while non-pigmented bulls had an average of 36.2°C with a standard deviation of 0.18°C. There was no significant difference between the pigmented and non-pigmented groups. This may be explained by the anatomical disposition of the testes in cattle, which, being pendulous and located in the inguinal region, are relatively protected from direct solar radiation. The body conformation of the animal provides natural shading, especially during periods of high solar intensity. Additionally, this anatomical condition of the scrotum in cattle increases the contact surface area with the environment, promoting heat dissipation. Thus, scrotal pigmentation did not result in changes in scrotal skin surface temperature in Nelore bulls aged between 14 and 18 months.

Keywords: Bull, Nelore, Testicular thermoregulation.

Abordagem terapêutica da oligoszoospermia em jumento (*Equus asinus*): relato de caso

Giovana Martins de Sá¹; Jaqueline Angelotti Hafemann¹; Thaini Barbosa Costa²; Pedro Victor Oliveira³

¹Discente da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brasil; ²Pós Graduada em Reprodução Animal - Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo Brasil; ³Medico Veterinário autônomo, São Paulo, SP

*E-mail: mv.giovanadesa@gmail.com

A oligoszoospermia é caracterizada pela baixa concentração de espermatozoides no ejaculado, comprometendo a fertilidade, esta condição pode estar relacionada a diversos fatores como orquite, trauma ou idade avançada. Relatos dessa condição em jumentos são escassos, tornando relevante a descrição de estratégias terapêuticas. Este estudo relata o tratamento de um jumento sem raça definida, 19 anos, 340 kg, com histórico de infertilidade, 0% (0/3 de éguas submetidas a monta natural). O exame físico geral não apresentou alterações, exceto durante a inspeção onde foi possível observar uma leve claudicação no membro torácico esquerdo, provavelmente esta condição é decorrente de sua senilidade e marcha característica. Já no exame físico específico, a biometria testicular apresentou respectivamente altura, largura e comprimento 9,6 x 4,5 x 4,0 cm (direito) e 8,7 x 3,7 x 3,6 cm (esquerdo), leve flacidez no testículo esquerdo, com mobilidade e sem presença de dor, através do exame ultrassonográfico foram observados pontos hiperecóticos no parênquima testicular esquerdo. Para a coleta do sêmen foi utilizado vagina artificial (Botupharma[®]) com água aquecida a 50°C, devido à falta de disposição do proprietário, foi realizado apenas uma coleta visto que o jumento estava em repouso sexual de apenas 2 dias, e não havia disponibilidade de deixar o animal alojado, durante a coleta foi possível observar excelente libido do mesmo. Nas características macroscópicas o ejaculado obteve volume de 40 mL, aspecto aquoso e odor característico sui generis, já na avaliação microscópica feita com microscópio binocular DigiLab (DI-136B Led), apresentou motilidade total de 50%, vigor 3 e concentração de apenas 8×10^6 spz/mL, caracterizando oligoszoospermia. A avaliação de patologia espermática foi feita com BotuVital (Botupharma[®]) e óleo de imersão com mesmo microscópio em aumento de 1000x, sendo observado 25% defeitos maiores e 20% defeitos menores. O tratamento instituído, incluiu repouso sexual por 60 dias, suplementação oral com Botumix Garanhão Plus[®] (60 mL/SID) e pentoxifilina oral em pasta, manipulada pela DrogaVet (8 mg/kg/SID) por 60 dias. Após este período, realizou-se nova coleta onde o ejaculado obteve volume de 35 mL, motilidade total de 70%, e vigor 4 e concentração de 32×10^6 spz/mL, com patologia espermática de 10% defeitos maiores e 15% defeitos menores. Recomendou-se a continuidade do protocolo por mais 60 dias antes do retorno à atividade reprodutiva. Posteriormente aos 120 dias de tratamento, foi realizada a monta natural controlada a cada 2 dias, excluindo os 2 primeiros dias de cio, e sendo realizada até o desaparecimento dos sinais, foi relatado sucesso reprodutivo por monta natural de 66% (2/3), porém sem nova avaliação espermática. A abordagem terapêutica mostrou-se eficaz na fertilidade de caso de oligoszoospermia, sugerindo sua viabilidade para casos semelhantes em jumentos.

Palavras-chave: biometria testicular; exame andrológico; infertilidade; monta natural; pentoxifilina.

Therapeutic approach to oligozoospermia in a donkey (*Equus asinus*): case report

Giovana Martins de Sá^{1*}, Jaqueline Angelotti Hafemann¹, Thaini Barbosa Costa²; Pedro Victor Oliveira³

¹Undergraduate Student at the University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil;

²Postgraduate Student in Animal Reproduction – University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil; ³Independent Veterinarian, São Paulo, SP, Brazil

*E-mail: mv.giovanadesa@gmail.com

Oligospermia is characterized by a low concentration of spermatozoa in the ejaculate, compromising fertility. This condition may be associated with several factors such as orchitis, trauma, or advanced age. Reports of this condition in donkeys are scarce, making the description of therapeutic strategies relevant. This study reports the treatment of a 19-year-old, 340 kg, mixed-breed donkey with a history of infertility, having achieved 0% pregnancy rate (0/3 mares subjected to natural mating). The general physical examination showed no abnormalities, except during inspection when a mild lameness in the left forelimb was observed, likely due to age-related issues and the animal's characteristic gait. In the specific physical examination, testicular biometry measured height, width, and length at 9.6 x 4.5 x 4.0 cm (right) and 8.7 x 3.7 x 3.6 cm (left), with slight flaccidity in the left testicle, which was mobile and non-painful. Ultrasound examination revealed hyperechoic spots in the left testicular parenchyma. Semen collection was performed using an artificial vagina (Botupharma®) with water heated to 50°C. Due to the owner's lack of availability, only one collection was performed, as the donkey had only had two days of sexual rest and could not be housed at the facility. During the collection, the donkey showed excellent libido. Macroscopic analysis of the ejaculate revealed a volume of 40 mL, watery appearance, and a sui generis characteristic odor. Microscopic evaluation with a DigiLab binocular microscope (DI-136B LED) showed total motility of 50%, vigor score of 3, and a concentration of only 8×10^6 sperm/mL, characterizing oligospermia. Sperm pathology assessment was conducted using BotuVital (Botupharma®) and immersion oil at 1000x magnification, revealing 25% major defects and 20% minor defects. The treatment protocol included 60 days of sexual rest, oral supplementation with Botumix Garanhão Plus® (60 mL once daily), and oral pentoxifylline in paste form, compounded by DrogaVet (8 mg/kg once daily) for 60 days. After this period, a new collection was performed, and the ejaculate showed a volume of 35 mL, total motility of 70%, vigor score of 4, and concentration of 32×10^6 sperm/mL, with sperm pathology showing 10% major defects and 15% minor defects. Continuation of the treatment protocol for another 60 days was recommended before returning to reproductive activity. After 120 days of treatment, controlled natural mating was performed every two days, excluding the first two days of estrus, and continued until signs of estrus disappeared. A reproductive success rate of 66% (2/3) through natural mating was reported, although no new sperm evaluation was performed. The therapeutic approach proved effective in restoring fertility in this case of oligospermia, suggesting its potential applicability in similar cases in donkeys.

Keywords: testicular biometry; andrological examination; infertility; natural breeding; pentoxifylline.

Influência da temperatura e umidade ambiental na qualidade espermática e fertilidade *in vivo* de touros de corte

Larysse Aparecida Alves^{1,4}, Reinaldo Fernandes Cooke¹, Fabiana Ferreira Souza¹, Marcelo Sant'Ana-Borges³, Vitor Hugo Rodrigues Branco de Miranda¹, Dyovana Giordani Nunes⁴, Luis Felipe Canela Souza⁴, Marcos Gomides Carvalho¹ Andre Maciel Crespilho^{2,4}

¹Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil. ²Universidade de Santo Amaro, São Paulo, Brasil. ³Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. ⁴Central Bela Vista (CRV Grupo), Botucatu, São Paulo, Brasil

*E-mail: larysse.alves@unesp.br

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do índice de temperatura e umidade (ITU) na qualidade dos espermatozoides coletados de touros de corte *Bos taurus*, *Bos indicus* e mestiços, e sua fertilidade em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), considerando o ITU no dia da colheita. O sêmen foi coletado e processado em Botucatu, SP, Brasil, sob clima subtropical úmido, entre os anos de 2020 e 2022. Utilizando 120 touros de três raças (Angus, n = 20; Brangus, n = 3; e Nelore, n = 97), com idades médias de 49,3, 54,5 e 50,4 meses, respectivamente (faixa etária de 20 a 159 meses), e pesos médios de 993, 1149 e 973 kg. Os reprodutores foram mantidos em piquetes individuais (20 × 20 m) com dieta de manutenção. As colheitas foram realizadas com vagina artificial, duas vezes ao dia, dois dias por semana, usando vacas como manequins. O sêmen foi diluído em OPTIXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, França) e avaliado quanto à motilidade (MT 0-100%) e vigor (escore 0-5) em microscopia de contraste de fase (100×). A concentração espermática (milhões/mL) foi determinada com o NucleoCounter® SP-100 (ChemoMetec, Lillerød, Dinamarca). A morfologia foi avaliada em alíquotas diluídas em formol salina a 4%, sob microscopia (1.000×), com 100 espermatozoides por lâmina. As amostras foram diluídas, envasadas em palhetas franceses de 0,25 mL (IMV Technologies, L'Aigle, França), resfriadas a 4 °C por 24 h e congeladas no DigitCool (IMV Technologies, L'Aigle, França), resfriando gradualmente o sêmen de 5 °C a -140 °C, então submersos e armazenados em nitrogênio líquido a -196 °C até o uso. A cinemática foi analisada por CASA IVOS® II (Integrated Visual Optical System II, Hamilton Thorne Ltd, Beverly, MA, EUA). Amostras com ≥40% de motilidade total e ≥30% progressiva respectivamente, foram consideradas aprovadas no controle de qualidade da Central de Coleta de Sêmen e comercializadas. Em seguida as palhetas foram utilizadas para IATF em 63 fazendas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, com 26.800 registros de gestação (5.129 de sêmen Angus; 1.217 de Brangus; e 20.454 de Nelore). O ITU foi calculado, adaptado e classificado em: <76 (leve), 76,2–79,2 (alerta), 79,2–84,1 (perigo) e >84,1 (emergência). As análises estatísticas foram conduzidas no SAS® 9.4. O procedimento MIXED foi usado para analisar a variância (ANOVA) das características do sêmen *in natura*, sêmen descongelado (CASA) e morfologia espermática. Para a variável taxa de concepção, utilizou-se o procedimento GLIMMIX com a opção logit e distribuição binomial (0 = negativo e 1 = grávida). A significância estatística foi declarada quando P < 0,05. Os resultados mostraram que altos intervalos de ITU afetaram negativamente as características de qualidade do espermatozoide (fresco e congelado-descongelado) e as taxas de prenhez nas raças estudadas. Houve redução acentuada de MT no sêmen fresco dos reprodutores Angus (Angus 68,43; Brangus 75,23; Nelore 70,26), quando o ITU estava no intervalo >84,1. O mesmo padrão foi observado no sêmen congelado-descongelado, tanto na motilidade total quanto a progressiva, sendo sempre as mais baixas para Angus (MT: Angus 52,07; Brangus 61,17; Nelore 56,03/MP: Angus 40,28; Brangus 49,81; Nelore 43,22). Ademais no mesmo intervalo de ITU, touros Brangus sempre apresentaram as menores taxas ALH (Angus 9,99; Brangus 6,28; Nelore 9,94) e VAP (Angus 105,10; Brangus 73,61; Nelore 102,32), em contrapartida as maiores para LIN (Angus 39,10; Brangus 47,68; Nelore 36,92). Ainda no maior intervalo de ITU, os touros e Nelore e Brangus tiveram taxas de prenhez maiores quando comparados aos reprodutores Angus (NE: 48,9%; BN: 58,2%; AN: 37,4%). Em conclusão, os touros Angus foram mais sensíveis ao estresse por calor em condições de alto ITU. Brangus e Nelore sendo melhor adaptados ao alto ITU, sustentando a qualidade do sêmen e fertilidade em clima subtropical.

Palavras chaves: bovinos de corte, estresse por calor, temperatura e umidade, clima subtropical

Agradecimentos: À CAPES, Brasil, código de financiamento 001. À empresa Central Bela Vista e CRV por ceder os dados e espaço para realização da pesquisa

Influence of temperature and environmental humidity on sperm quality and *in vivo* fertility of beef bulls

Larysse Aparecida Alves^{1,4}, Reinaldo Fernandes Cooke¹, Fabiana Ferreira Souza¹, Marcelo Sant'Ana-Borges³, Vitor Hugo Rodrigues Branco de Miranda¹, Dyovana Giordani Nunes⁴, Luis Felipe Canela Souza⁴, Marcos Gomides Carvalho¹ Andre Maciel Crespilho^{2,4}

¹São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil. ²University of Santo Amaro, São Paulo, Brazil. ³São Paulo State University, Jaboticabal, São Paulo, Brazil. ⁴Central Bela Vista Center (CRV Group), Botucatu, São Paulo, Brazil

*E-mail: larysse.alves@unesp.br

The objective of this study is to evaluate the effects of temperature and humidity index (THI) on the quality of sperm collected from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and crossbred beef bulls, and their fertility in fixed-time artificial insemination (FTAI) programs, considering the THI on the day of collection. Semen was collected and processed in Botucatu, SP, Brazil, under a humid subtropical climate, between 2020 and 2022. Using 120 bulls of three breeds (Angus, n = 20; Brangus, n = 3; and Nelore, n = 97), with average ages of 49.3, 54.5, and 50.4 months, respectively (age range 20 to 159 months), and average weights of 993, 1149, and 973 kg. Bulls were kept in individual paddocks (20 × 20 m) on a maintenance diet. Collections were performed with an artificial vagina, twice a day, two days a week, using cows as dummies. Semen was diluted in OPTIXcell® (IMV Technologies, L'Aigle, France) and evaluated for motility (MT 0–100%) and vigor (score 0–5) under phase contrast microscopy (100×). Sperm concentration (millions/mL) was determined using a NucleoCounter® SP-100 (ChemoMetec, Lillerød, Denmark). Morphology was evaluated in aliquots diluted in 4% saline formalin under microscopy (1,000×), with 100 sperm per slide. Samples were diluted, filled into 0.25 mL French straws (IMV Technologies, L'Aigle, France), cooled at 4 °C for 24 h and frozen in DigitCool (IMV Technologies, L'Aigle, France), gradually cooling the semen from 5 °C to -140 °C, then submerged and stored in liquid nitrogen at -196 °C until use. Kinematics were analyzed by CASA IVOS® II (Integrated Visual Optical System II, Hamilton Thorne Ltd, Beverly, MA, USA). Samples with ≥40% total motility and ≥30% progressive motility, respectively, were considered to have passed the quality control of the Semen Collection Center and were commercialized. The straws were then used for TAI on 63 farms in the southern, southeastern and central-western regions of Brazil, with 26,800 pregnancy records (5,129 from Angus semen; 1,217 from Brangus; and 20,454 from Nelore). The THI was calculated, adapted and classified as: <76 (mild), 76.2–79.2 (alert), 79.2–84.1 (danger) and >84.1 (emergency). Statistical analyses were conducted in SAS® 9.4. The MIXED procedure was used to analyze the variance (ANOVA) of the characteristics of fresh semen, frozen-thawed semen (CASA) and sperm morphology. For the conception rate variable, the GLIMMIX procedure was used with the logit option and binomial distribution (0 = negative and 1 = pregnant). Statistical significance was declared when P < 0.05. The results showed that high THI ranges negatively affected sperm quality traits (fresh and frozen-thawed) and pregnancy rates in the studied breeds. There was a marked reduction in MT in fresh semen of Angus sires (Angus 68.43; Brangus 75.23; Nelore 70.26) when THI was in the range >84.1. The same pattern was observed in frozen-thawed semen, both in total and progressive motility, always being the lowest for Angus (MT: Angus 52.07; Brangus 61.17; Nelore 56.03/ MP: Angus 40.28; Brangus 49.81; Nelore 43.22). Furthermore, in the same THI range, Brangus bulls always presented the lowest ALH (Angus 9.99; Brangus 6.28; Nelore 9.94) and VAP (Angus 105.10; Brangus 73.61; Nelore 102.32) rates, while the highest for LIN (Angus 39.10; Brangus 47.68; Nelore 36.92). Still in the highest THI range, Nelore and Brangus bulls had higher pregnancy rates when compared to Angus sires (NE: 48.9%; BN: 58.2%; AN: 37.4%). In conclusion, Angus bulls were more sensitive to heat stress under high THI conditions. Brangus and Nelore are better adapted to high THI, sustaining semen quality and fertility in a subtropical climate.

Keywords: beef cattle, heat stress, temperature and humidity, subtropical climate

Acknowledgements: To CAPES, Brazil, financing code 001. To the company Central Bela Vista and CRV for providing the data and space for the research.

Expressão de microRNAs relacionados ao processo de capacitação espermática em sêmen bovino *in natura* e criopreservado

Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves², Cibele Maria Prado Zinni³, Yulizabeth Daniela Pinto Rojas³, André Furugen Cesar de Andrade⁴, Rubens Paes de Arruda⁵, Juliano Coelho da Silveira³, Felipe Perecin³, 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, ³Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, 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: celeghini@usp.br

A capacitação espermática é um processo essencial para o sucesso da fertilização e, embora os microRNAs (miRNAs) espermáticos atuem como reguladores moleculares da fertilidade em bovinos, seu papel é desconhecido na regulação deste processo. Assim, este estudo visou compreender a relação entre a capacitação espermática e o perfil de miRNA espermático em sêmen fresco e criopreservado de touros Nelore com alta e baixa responsividade à capacitação espermática. Para tal, este experimento foi realizado em duas etapas. Na primeira, três ejaculados de doze touros da raça Nelore foram colhidos e distribuídos em quatro tratamentos: CO: fresco (controle), CAP: fresco induzido à capacitação espermática *in vitro*, CRI: criopreservado e CRICAP: criopreservado e induzido à capacitação espermática *in vitro*. Todas as amostras foram analisadas quanto aos eventos da capacitação espermática (desorganização dos fosfolípidos de membrana plasmática, susceptibilidade da membrana plasmática à peroxidação lipídica, efluxo de colesterol, translocação da fosfatidilserina, reação acrossomal e potencial de membrana mitocondrial) e a partir destes resultados, foram selecionados os touros de mais alta (AtR, n = 4) e os de mais baixa (BxR, n = 4) resposta à capacitação espermática. Na segunda etapa, um pool dos três ejaculados de cada touro foi usado para a quantificação de miRNAs nas amostras dos touros de AtR e BxR dos grupos (CO, CAP, CRI e CRICAP). Antes da análise dos miRNAs, as amostras foram submetidas a um protocolo de lise de células somáticas e em seguida, foram submetidas a extração de RNA e análise dos níveis de abundância relativa de miRNAs maduros, por PCR quantitativo em tempo real (QuantStudio 6 Real-Time PCR System - Applied Biosystems). Inicialmente foi avaliado um perfil de 384 miRNAs maduros nas amostras CO e CAP (sêmen fresco), normalizando os dados dos miRNAs pela média geométrica do RNA endógeno (snRNA Hm/Ms/Rt T1). A seguir, dos 384 miRNAs, foram selecionados 33 considerando um CT > 37 para posterior análise nas amostras CRI e CRICAP (sêmen criopreservado). Este experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e um arranjo em fatorial 2x4, considerando a responsividade à capacitação espermática de touros (AtR e BxR) e os tratamentos do sêmen (CO, CAP, CRI e CRICAP). A análise estatística foi realizada no software Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 9.3), considerando um nível de significância quando $P \leq 0,05$. A análise de variância foi realizada usando o procedimento MIXED do SAS. Para a estatística dos miRNAs, foram utilizados os valores obtidos da subtração dos valores de delta-Ct (DCt) com a média geométrica do RNA endógeno (snRNA Hm/Ms/Rt T1). Em seguida, a expressão relativa foi calculada usando o método 2^{-DCt} . Nos resultados, notou-se que 14 miRNAs foram expressos exclusivamente no grupo CO, 7 no grupo CAP e 12 expressos em ambos os grupos. Quando se considerou a responsividade à capacitação, foi encontrado um miRNA expresso exclusivamente no grupo AtR (bta-miR-191) e dois exclusivos do grupo BxR (bta-miR-18a e bta-miR-106a) do sêmen criopreservado. Desta forma, conclui-se que o bta-miR-191 pode ser um potencial biomarcador para processos de capacitação espermática em amostras de sêmen pós-criopreservação. Além disso, os miRNAs bta-miR-18a e bta-miR-106a podem estar relacionados a efeitos deletérios na capacitação espermática. No entanto, um teste de enriquecimento funcional é necessário para auxiliar na compreensão desses achados.

Palavras-chave: espermatozoides, fosfatidilserina, reação acrossomal, RNAs.

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

Expression of microRNAs related to the sperm capacitation process in fresh and cryopreserved bovine semen

Laura Nataly Garcia-Oliveros¹, Alexandre da Rocha Bozzi¹, Thais de Oliveira Cardoso Silva¹, Fernanda Baatsch Nascimento¹, Thainara Rodrigues de Oliveira¹, Maíra Bianchi Rodrigues Alves², Cibele Maria Prado Zinni³, Yulizabeth Daniela Pinto Rojas³, André Furugen Cesar de Andrade⁴, Rubens Paes de Arruda⁵, Juliano Coelho da Silveira³, Felipe Perecin³, 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, ³Department of Veterinary Medicine, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brazil, 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: celeghin@usp.br

Sperm capacitation is an essential process for successful fertilization, and although sperm microRNAs (miRNAs) act as molecular regulators of fertility in cattle, their role in regulating this process is unknown. Thus, this study aimed to understand the relationship between sperm capacitation and sperm miRNA profile in fresh and cryopreserved semen from Nelore bulls with high and low responsiveness to sperm capacitation. To this end, this experiment was performed in two stages. In the first, three ejaculates from twelve Nelore bulls were collected and distributed into four treatments: CO: fresh (control), CAP: fresh induced to *in vitro* sperm capacitation, CRY: cryopreserved and CRYCAP: cryopreserved and induced to *in vitro* sperm capacitation. All samples were analyzed for sperm capacitation events (plasma membrane phospholipid disorganization, plasma membrane susceptibility to lipid peroxidation, cholesterol efflux, phosphatidylserine translocation, acrosomal reaction and mitochondrial membrane potential) and from these results, the bulls with the highest (HrC, n = 4) and those with the lowest (LrC, n = 4) response to sperm capacitation were selected. In the second stage, a pool of three ejaculates from each bull was used to quantify miRNAs in samples from HrC and LrC bulls from the groups (CO, CAP, CRY, and CRYCAP). Before miRNA analysis, the samples were subjected to a somatic cell lysis protocol and then submitted to RNA extraction and analysis of the relative abundance levels of mature miRNAs by real-time quantitative PCR (QuantStudio 6 Real-Time PCR System - Applied Biosystems). Initially, a profile of 384 mature miRNAs was evaluated in the CO and CAP samples (fresh semen), normalizing the miRNA data by the geometric mean of endogenous RNA (snRNA Hm/Ms/Rt T1). Then, of the 384 miRNAs, 33 were selected considering a CT > 37 for later analysis in the CRY and CRYCAP samples (cryopreserved semen). This experiment followed a completely randomized design (CRD) and a 2x4 factorial arrangement, considering the responsiveness to sperm capacitation of bulls (HrC and LrC) and the semen treatments (CO, CAP, CRY and CRYCAP). Statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System software (SAS Institute Inc., 9.3), considering a significance level when $P \leq 0.05$. Analysis of variance was performed using the MIXED procedure of SAS. For miRNA statistics, the values obtained by subtracting the delta-Ct (DCt) values from the geometric mean of the endogenous RNA (snRNA Hm/Ms/Rt T1) were used. Then, the relative expression was calculated using the 2^{-DCt} method. In the results, it was noted that 14 miRNAs were exclusively expressed in the CO group, 7 in the CAP group and 12 expressed in both groups. When considering the responsiveness to capacitation, one miRNA was found to be expressed exclusively in the HrC group (bta-miR-191) and two exclusive to the LrC group (bta-miR-18a and bta-miR-106a) of cryopreserved semen. Thus, it is concluded that bta-miR-191 may be a potential biomarker for sperm capacitation processes in post-cryopreservation semen samples. Furthermore, the miRNAs bta-miR-18a and bta-miR-106a may be related to deleterious effects on sperm capacitation. However, a functional enrichment test is necessary to help understand these findings.

Keywords: semen cryopreservation, sperm capacitation, bull, miRNAs.

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

Influência de três sistemas de manejo na qualidade espermática de touros Nelore

Charlene Karollaine de Castro Dourado^{1*}, Aline Pacheco¹, Ana Beatriz Fonseca de Oliveira¹, Kedson Alessandri Lobo Neves¹, Adria Fernanda Ferreira de Moraes¹, Letícia dos Santos Rebelo²

¹Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Santarém Pará

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: zoovetcharlene@gmail.com

Com o aumento da temperatura global devido as alterações climáticas, o estresse térmico vem trazendo preocupações para o futuro da pecuária, visto que essa alteração faz com que o animal não exerça as funções normais do seu organismo. Na mesorregião do Baixo Amazonas, onde se observam dois períodos climáticos e os sistemas de produção de ruminantes são tradicionalmente classificados em três tipos: o sistema tradicional (ST), no qual os animais não têm acesso a sombra nem a água para banho; o sistema Silvipastoril (SS), que oferece sombra, mas não água para banho; e o sistema integrado (SI), que proporciona ambos os recursos. Este estudo visa avaliar a influência dos períodos do ano e de como os três sistemas de criação podem interferir na qualidade seminal de touros da raça Nelore. Foram utilizados 15 touros Nelore, divididos igualmente em três sistemas, quais sejam, silvipastoril (SP) (n=5), tradicional (ST) (n=5) e integrado (SI) (n=5). Foi realizada avaliação física e morfológica do sêmen observando as variáveis como motilidade, vigor, turbilhonamento, concentração espermática e defeitos espermáticos. As coletas e avaliações foram realizadas em setembro, outubro e novembro de 2023 (período menos chuvoso) e em abril, maio e junho (período mais chuvoso). Cada touro passou por seis coletas com intervalo de 30 dias. Todos os dados passaram por análises preliminares para obtenção de médias, desvios padrão, coeficientes de variação. Foram analisados considerando-se 5% de significância com auxílio de software Statistical Analysis System - SAS. Houve diferença significativa ($p<0,05$) entre os sistemas de criação (ST, SS e SI) e entre os períodos (mais chuvoso e menos chuvoso) para as variáveis peso corporal dos animais, e para as características seminais volume, motilidade e defeitos maiores. Houve diferença significativa ($p<0,05$) na motilidade apenas entre os períodos do ano, mais chuvoso ($71,54\pm 11,97$) e menos chuvoso ($55,38\pm 26,57$) no ST. O SI teve destaque significativo ($p<0,05$) no período menos chuvoso, com menor quantidade de defeitos maiores ($6,77\pm 3,52$) além de uma menor incidência entre os sistemas ST ($11,54\pm 9,10$) e SS ($9,77\pm 3,65$). A concentração espermática encontrou melhores médias no período mais chuvoso para o SS ($498,7\pm 457,5$), em comparação ao ST ($410,8\pm 217,9$) e SI ($459,3\pm 347,9$). Os resultados deste estudo indicam que tanto períodos climáticos quanto sistemas de criação influenciam significativamente a qualidade seminal, reforçando a importância de estratégias sustentáveis para a pecuária frente às mudanças climáticas.

Palavras-chave: Chuva, defeitos espermáticos, estações do ano, espermograma, sistema de criação.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Influence of Three Management Systems on Semen Quality of Nelore Bulls

Charlene Karollaine de Castro Dourado^{1*}, Aline Pacheco¹, Ana Beatriz Fonseca de Oliveira¹, Kedson Alessandri Lobo Neves¹, Adria Fernanda Ferreira de Moraes¹, Letícia dos Santos Rebelo²

¹Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA, Santarém Pará

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Brasil

*E-mail: zoovetcharlene@gmail.com

With the rise in global temperatures due to climate change, thermal stress has become a growing concern for the future of livestock farming, as it compromises the animals' ability to perform normal physiological functions. In the Baixo Amazonas mesoregion, which presents two distinct climatic periods, ruminant production systems are traditionally classified into three types: the traditional system (ST), where animals have no access to shade or water for bathing; the silvopastoral system (SS), which provides shade but no bathing water; and the integrated system (SI), which offers both resources. This study aims to evaluate the influence of seasonal periods and how the three management systems affect the semen quality of Nelore bulls. A total of 15 Nelore bulls were used, equally distributed among the three systems: silvopastoral (SS) (n=5), traditional (ST) (n=5), and integrated (SI) (n=5). Physical and morphological semen evaluations were carried out, considering variables such as motility, vigor, swirl, sperm concentration, and sperm defects. Collections and analyses were performed during September, October, and November 2023 (drier season), and April, May, and June (rainier season). Each bull underwent six collections at 30-day intervals. All data underwent preliminary analysis to obtain means, standard deviations, and coefficients of variation. Statistical analysis was performed at a 5% significance level using the Statistical Analysis System (SAS) software. A significant difference ($p<0.05$) was observed among the management systems (ST, SS, and SI) and between the seasons (rainy and dry) for the variables body weight, and seminal characteristics such as volume, motility, and major defects. A significant difference ($p<0.05$) in motility was found only between seasons in the TS group, with higher values during the rainy season (71.54 ± 11.97) compared to the dry season (55.38 ± 26.57). The SI system showed a significant advantage ($p<0.05$) during the dry period, presenting the lowest rate of major defects (6.77 ± 3.52), with lower incidence compared to ST (11.54 ± 9.10) and SS (9.77 ± 3.65). Sperm concentration yielded better average values during the rainy season in the SS group (498.7 ± 457.5), compared to ST (410.8 ± 217.9) and SI (459.3 ± 347.9). The results of this study indicate that both climatic periods and management systems significantly affect semen quality, highlighting the importance of sustainable strategies for livestock production in the face of climate change.

Keywords: Rainfall, sperm defects, seasons, spermogram, management system.

Acknowledgments: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

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, Máira Bianchi Rodrigues Alves², Raissa Braidó 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 convencionais 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 fosfolípidios 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 (AFaT) e baixa responsividade (BxR) à capacitação espermática. Dentro do grupo AF foram selecionados 5 touros de AFaT (AFaT, 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 AFaT 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 AFaT 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 diferentemente expressos em estudos anteriormente em touros com alta e baixa fertilidade e associados com às características de qualidade espermática e eventos de capacitação espermática. Os achados indicam que esses miRNAs podem proteger os espermatozoides contra capacitação prematura e promover a capacitação no momento adequado. Assim, este estudo sugere o potencial de miRNAs como promissores candidatos a biomarcadores para avaliação da fertilidade em touros Nelore, mas evidencia a necessidade de mais estudos para fortalecer estes achados.

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 conventional 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 Nelore 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 differentially expressed in previous studies in bulls with high and low fertility and associated with sperm quality traits and sperm capacitation events. The findings indicate that these miRNAs may protect sperm against premature capacitation and promote capacitation at the appropriate time. Thus, this study suggests the potential of miRNAs as promising biomarker candidates for fertility assessment in Nelore bulls, but highlights the need for further studies to strengthen these findings.

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.

Identificação e Caracterização de Subpopulações Cinéticas Espermáticas em Sêmen Fresco e Descongelado de Jumentos

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo^{1,2}, Fernando Eiras de Barros Pinto³, Pedro Victor de Luna Freire Oliveira⁴, Vinicius Wagner Silva¹, Rodrigo Yudi Palhaci Marubayashi⁵, Camila Bortoliero Costa Giovannetti⁶, Maria Isabel Mello Martins^{1,7*}

¹Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida – LARAA-Uel, Londrina, Brasil; ²Docente, Setor de Medicina Veterinária, CCA-UENP, Bandeirantes, Brasil; ³Mestrando do programa Saúde e Produção Animal pela Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, Araçongas, Brasil; ⁴Médico Veterinário Autônomo, São Paulo, Brasil; ⁵Departamento de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, CCA-UEL, Londrina, Brasil; ⁶Docente, Departamento de Zootecnia, CCA-UEL, Londrina, Brasil; ⁷Docente, Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA-UEL, Londrina, Brasil.

*E-mail: imartins@uel.br

A heterogeneidade do ejaculado é variável entre os machos e métodos de avaliação mais rigorosos são necessários para identificar os ejaculados adequados para IA. O padrão das distribuições de subpopulações cinéticas de espermatozoides varia quando são submetidas a mudanças de temperatura e podem levar a uma redução acentuada na qualidade e, consequentemente fertilidade. Este estudo teve como objetivo identificar e comparar subpopulações de cinética espermática à fresco e pós-descongelamento de jumentos que apresentaram baixo, médio e alto desempenho reprodutivo com base nas taxas de prenhez. Foram utilizados seis jumentos da raça Pêga de fertilidade comprovada, com idades entre 5 e 15 anos. As amostras de sêmen foram obtidas de três ejaculados de cada um dos seis jumentos. A colheita de sêmen foi realizada com auxílio de vagina artificial após estimulação dos machos pela presença de jumentas em cio. Posteriormente, o sêmen foi filtrado para retirada da fração gel, sendo utilizados apenas os ejaculados que atingiram motilidade igual ou superior a 70%. Para a criopreservação, o sêmen foi diluído e congelado em meio comercial (Botucurio®, Botupharma, São Paulo) e a descongelamento foi feita em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Para caracterizar as subpopulações de espermatozoides, as amostras (Fresco e Pós-descongelamento) foram analisadas pelo sistema CASA (software HTM-IVOS EDIT/SORT) e por análise estatística multivariada. Com base nos registros de taxa de prenhez (N=110 Jumentas), três grupos foram estabelecidos: grupo de baixo desempenho (N=2; BAIXO), incluindo jumentos que apresentaram taxas médias de prenhez de 59,16% (58,33% a 60%); grupo de médio desempenho (N= 2; MÉDIO), incluindo jumentos com taxas médias de prenhez =75% e um grupo de alto desempenho (N=2; ALTO), com taxas médias de prenhez de 81,65% após inseminação artificial com sêmen fresco. Nos procedimentos de clusters, quatro subpopulações de espermatozoides foram estabelecidas. A subpopulação 1 (SP1) incluiu espermatozoides rápidos, progressivos e lineares com baixa oscilação; a subpopulação 2 (SP2) incluiu espermatozoides lentos, progressivos e lineares com baixa trajetória sinuosa; a subpopulação 3 (SP3) incluiu espermatozoides com padrão hiperativo, sinuosos com baixa linearidade e a subpopulação 4 (SP4) incluiu espermatozoides lentos com baixa progressividade e linearidade e alta oscilação. No grupo BAIXO, amostras frescas apresentaram a maior porcentagem da SP 4 (40,82%), no entanto, após a criopreservação exibiram maiores proporções das SP 1 (37,30%) e 4 (31,75%). No grupo MÉDIO, amostras frescas apresentaram maiores porcentagens das SP 1 (33,15%) e SP 4 (25,87%), porém, após a criopreservação exibiram maiores proporções das SP 1 (34,27%) e SP2 (30,45%). Por outro lado, no grupo ALTO, as amostras frescas apresentaram uma maior porcentagem da SP 1 (29,83%), seguida da SP 3 (27,34%). Após a criopreservação, foi possível observar maiores porcentagens da SP 2 (29,63%), seguida da SP 1 (28,90%). Os resultados deste estudo indicaram que machos com maiores porcentagens de espermatozoides rápidos e lineares a fresco, parecem ter maior capacidade de fertilização e a análise de subpopulações pode ser considerada uma ferramenta útil para identificar ejaculados com alta fertilidade.

Palavras-chave: semen, criopreservação, sistema CASA, IA, asininos.

Influence of sperm subpopulations on donkey pregnancy rates

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo^{1,2}, Fernando Eiras de Barros Pinto³, Pedro Victor de Luna Freire Oliveira⁴, Vinicius Wagner Silva⁴, Rodrigo Yudi Palhaci Marubayashi⁵, Camila Bortoliero Costa Giovannetti⁶, Maria Isabel Mello Martins^{1,7*}

¹Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida – LARAA-UEL, Londrina, Brasil; ²Docente, Setor de Medicina Veterinária, CCA-UENP, Bandeirantes, Brasil; ³Mestrando do programa Saúde e Produção Animal pela Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, Arapongas, Brasil; ⁴Médico Veterinário Autônomo, São Paulo, Brasil; ⁵Departamento de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina, CCA-UEL, Londrina, Brasil; Docente, ⁶Departamento de Zootecnia, CCA-UEL, Londrina, Brasil; ⁷Docente, Departamento de Clínicas Veterinárias, CCA-UEL, Londrina, Brasil

*E-mail: imartins@uel.br

The heterogeneity of ejaculate indicates that fertility is still variable among males and that more stringent evaluation methods are needed to identify the ejaculates suitable for AI. Furthermore the standard distributions of sperm subpopulations vary when they are subjected to temperature changes and can lead to a marked reduction in fertility. Thus, this study aimed to identify and compare subpopulations of fresh and post-thawed sperm from donkeys with low, medium and high reproductive performance based on pregnancy rates. Six Pêga donkeys with proven fertility, aged between 5 and 15 years, were used. Semen samples were obtained from three ejaculates from each of the six donkeys. Semen collection was performed by artificial vagina after stimulation of the males by female donkeys in estrus. Subsequently, the semen was filtered to remove the gel fraction, and only ejaculates that reached motility equal to or greater than 70% were used. For cryopreservation, the semen was diluted and frozen in a commercial extender (Botucurio®, Botupharma, São Paulo) and thawed in a water bath at 37 °C for 30 seconds. To characterize sperm subpopulations, samples (fresh and post-thaw) were analyzed by the CASA system (HTM-IVOS EDIT/SORT software) and by multivariate statistical analysis. Based on pregnancy rate records (N=110 donkeys), three groups were established: a low performance group (N=2; LOW), including donkeys that presented average pregnancy rates of 59.16% (58.33% to 60%); a medium performance group (N=2; MEDIUM), including donkeys with average pregnancy rates =75%; and a high performance group (N=2; HIGH), with average pregnancy rates of 81.65% after artificial insemination with fresh semen. In the cluster procedures, four sperm subpopulations were established. Subpopulation 1 (SP1) included fast, progressive, linear sperm with low oscillation; Subpopulation 2 (SP2) included Slow, progressive and linear sperm with low sinuous trajectory; Subpopulation 3 (SP3) included Hyperactive pattern, sinuous sperm with low linearity and Subpopulation 4 (SP4) included slow sperm with low progressivity and linearity and high oscillation. In the LOW group, fresh samples presented the highest percentage of SP 4 (40.82 %), while after cryopreservation exhibited the higher proportions of SP 1 (37.30%) and SP4 (31.75%). In the Medium group, fresh samples presented the higher percentages of SP 1 (33.15%) and SP 4 (25.87%), while after cryopreservation exhibited the higher proportions of SP 1 (34.27%) and SP 2 (30.45%). In the other hand, in the HIGH group, fresh samples presented a higher percentage of SP 1 (29.83%), followed by SP 4 (27.34%). After cryopreservation, the samples presented a higher percentages of SP 2 (29.63%), followed by SP 1 (28.90%). Results from this study indicated that males with greater percentages of fast and linear spermatozoa in fresh samples seem to have greater fertilization capacity and the subpopulations analysis can be considered a tool to identify ejaculates with high fertility.

Keywords: semen, cryopreservation, CASA system, AI, donkeys.