

Obtenção de espermatozoides viáveis de catetos (*Pecari tajacu*) a partir de epidídimos armazenados a longo prazo sob refrigeração a 5 °C

Romário Parente dos Santos¹; Andréia Maria da Silva¹; Luana Grasielle Pereira Bezerra¹; Yuri Gonçalves Matos¹; Gabriel Santos Costa Bezerra¹; Tayná Moura Matos¹; Gabriela Linhares Leite¹; Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

*E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Apesar do advento das técnicas de reprodução assistida, sua aplicação em programas de conservação de animais selvagens é ainda incipiente, principalmente, devido ao limitado número de laboratórios aptos a conservarem o seu germoplasma. Para suplantar esse obstáculo, o acondicionamento refrigerado tanto de espermatozoides como de complexos testículo-epidídimo obtidos de animais que vieram subitamente a óbito em reservas, zoológicos e centros de criação, poderia possibilitar o seu transporte até laboratórios especializados aptos em criopreservar esse valioso germoplasma. Assim, o desenvolvimento deste estudo se justifica pois os catetos são animais selvagens de grande importância ecológica, cujas populações estão declinando em alguns biomas como a Caatinga e a Mata Atlântica, mas a espécie permanece estável em biomas como a Amazonia. Neste contexto, objetivou-se verificar os efeitos do armazenamento refrigerado do epidídimo de catetos (*Pecari tajacu*) em um dispositivo de transporte a 5 °C sobre a qualidade dos espermatozoides epididimários. Após a aprovação dos procedimentos experimentais pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Semiárido (UFERSA - Parecer nº 41/2024) e SISBIO (nº 72170-3), foi realizada a eutanásia de três catetos adultos provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil), localizado a 5°10' S e 37°10' W, a uma altitude de 16 m. Os complexos testículo-epidídimo (n = 6) foram coletados e imediatamente examinados. Os epidídimos foram selecionados por meio de randomização, sendo os epidídimos direito e esquerdo analisados separadamente e agrupados em dois grupos distintos: 1) recuperação epididimária imediata (n = 3) e 2) recuperação após 24 horas de refrigeração (n = 3). O grupo de epidídimos destinado à refrigeração foi acondicionado em um dispositivo de transporte (BotuFLEX®, Botupharma, Botucatu, Brasil) a 5°C por 24 horas. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de lavagem retrógrada utilizando 2 ml de diluente à base de Tris. Após a recuperação, foram avaliados os seguintes parâmetros: volume recuperado (micropipetagem), concentração (câmara de Neubauer), motilidade total e progressiva (análise computadorizada), funcionalidade e integridade de membrana (teste hiposmótico e sondas fluorescentes). Os resultados (média e erro padrão) foram comparados por meio do teste t de Student para amostras independentes (P < 0,05). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (recuperação imediata e recuperação após 24 horas). O volume recuperado foi de aproximadamente 1,5 ± 0,1 e 1,7 ± 0,2 mL, respectivamente, com concentrações de 545,0 ± 157,4 e 489,5 ± 134,8 × 10⁶ de espermatozoides/mL. A motilidade total observada nos grupos 1 e 2 foi de 89,3 ± 1,8 e 83,0 ± 5,0%, enquanto a motilidade progressiva apresentou valores de 51,7 ± 8,4 e 45,0 ± 7,2%, respectivamente. Além disso, as amostras apresentaram funcionalidade de 90,0 ± 2,2 e 80,0 ± 5,0%, e integridade de membrana de 90,0 ± 0,6 e 85,0 ± 6,7%, respectivamente. De modo geral, observa-se que os procedimentos de refrigeração e armazenamento conferem um ambiente adequado ao epidídimo, permitindo seu transporte e a posterior recuperação de espermatozoides viáveis a serem utilizados em outras biotecnologias, assim contribuindo para a formação de biobancos. Em conclusão, os epidídimos de catetos podem ser eficientemente armazenados e transportados por 24 horas, sem o comprometimento dos parâmetros espermáticos após a refrigeração. Essas descobertas são especialmente relevantes para seu uso prático no campo, quando não é possível realizar a criopreservação imediata de amostras post-mortem.

Palavras-chave: conservação, germoplasma, biobanco, BotuFLEX®.

Financiamento: CNPq, CAPES

Obtaining viable spermatozoa of collared peccaries (*Pecari tajacu*) from epididymis stored long-term under refrigeration at 5 °C

Romário Parente dos Santos¹; Andréia Maria da Silva¹; Luana Grasielle Pereira Bezerra¹; Yuri Gonçalves Matos¹; Gabriel Santos Costa Bezerra¹; Tayná Moura Matos¹; Gabriela Linhares Leite¹; Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Federal Rural University of the Semi-arid Region – UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

*E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Despite the advent of assisted reproduction techniques, their application in wildlife conservation programs is still incipient, mainly due to the limited number of laboratories capable of preserving germplasm. To overcome this obstacle, refrigerated storage of both spermatozoa and testicle-epididymis complexes obtained from animals that suddenly died in reserves, zoos, and breeding centers could enable their transport to specialized laboratories capable of cryopreserving this valuable germplasm. Then, the development of this study is justified because collared peccaries are wild animals of great ecological importance, whose populations are declining in some biomes, such as the Caatinga and the Atlantic Forest, while remaining stable in others, such as the Amazon. In this context, the objective was to verify the effects of refrigerated storage of the epididymis of collared peccaries (*Pecari tajacu*) in a transport device at 5°C on the quality of epididymal spermatozoa. After the approval of experimental procedures by the Animal Ethics Committee of the Federal University of the Semi-Arid Region (UFERSA - Opinion No. 41/2024) and SISBIO (No. 72170-3), euthanasia was performed on three adult collared peccaries from the Wild Animal Multiplication Center (CEMAS - UFERSA, Mossoró, RN, Brazil), located at 5°10' S and 37°10' W, at an altitude of 16 m. The testicle-epididymis complexes (n = 6) were collected and immediately examined. The epididymides were selected randomly, with the right and left epididymides analyzed separately and grouped into two distinct groups: (1) immediate epididymal sperm retrieval (n = 3) and (2) retrieval after 24 hours of refrigeration (n = 3). The epididymides designated for refrigeration were stored in a transport device (BotuFLEX®, Botupharma, Botucatu, Brazil) at 5°C for 24 hours. Sperm retrieval from the epididymal tail was performed using the retrograde flushing technique with 2 mL of a Tris-based extender. After retrieval, the following parameters were evaluated: recovered volume (micropipetting), concentration (Neubauer chamber), total and progressive motility (computerized analysis), membrane functionality and integrity (hypo-osmotic test and fluorescent probes). The results (mean and standard error) were compared using Student's t-test for independent samples ($P < 0.05$). No significant differences were observed between the experimental groups (immediate retrieval and retrieval after 24 hours). The recovered volume was approximately 1.5 ± 0.1 and 1.7 ± 0.2 mL, respectively, with concentrations of 545.0 ± 157.4 and $489.5 \pm 134.8 \times 10^6$ spermatozoa/mL. Total motility observed in groups 1 and 2 was $89.3 \pm 1.8\%$ and $83.0 \pm 5.0\%$, while progressive motility values were $51.7 \pm 8.4\%$ and $45.0 \pm 7.2\%$, respectively. Additionally, the samples presented functionality of $90.0 \pm 2.2\%$ and $80.0 \pm 5.0\%$, and membrane integrity of $90.0 \pm 0.6\%$ and $85.0 \pm 6.7\%$, respectively. Overall, refrigeration and storage procedures provide a suitable environment for the epididymis, allowing its transport and the subsequent retrieval of viable spermatozoa to be used in other biotechnologies, thus contributing to the formation of biobanks. In conclusion, the epididymides of collared peccaries can be efficiently stored and transported for 24 hours without compromising sperm parameters after refrigeration. These findings are particularly relevant for practical field use when immediate post-mortem sample cryopreservation is not feasible.

Keywords: conservation, germplasm, biobank, BotuFLEX®.

Financial support: CNPq, CAPES

Efeito de diferentes meios sobre a viabilidade celular e a integridade do DNA no tecido testicular de catetos adultos durante o cultivo organotípico

Tayná Moura Matos¹ *, Andréia Maria da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Lilian Leal Danta¹, Romário Parente dos Santos,¹ Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, Brasil

*E-mail: taynamouramatos@gmail.com

Nos últimos anos, a tecnologia do tecido testicular tem surgido como uma alternativa efetiva para a conservação do germoplasma masculino, uma vez que permitiria um estoque ilimitado de espermatogônias e, consequentemente, de espermatozoides para aplicação em outras biotecnologias. Paralelamente aos avanços nos protocolos de criopreservação, é necessário o desenvolvimento de estratégias de utilização daquele germoplasma por meio do cultivo *in vitro*, cujo sucesso pode ser influenciado por diferentes fatores, tais como a idade do animal e o meio utilizado. No presente estudo, objetivou-se comparar diferentes meios (DMEM, MEM e DMEM/F12) utilizados no cultivo *in vitro* organotípico do tecido testicular de catetos (*Pecari tajacu*) adultos. Salienta-se que os catetos são animais selvagens de grande importância ecológica, cujas populações estão declinando em alguns biomas como a Caatinga e a Mata Atlântica. Os procedimentos foram autorizados pelo Comitê de Ética da UFERSA (Parecer nº 24/2023), com autorização SISBIO nº 72170-3. Assim, após eutanásia, foram coletadas as gônadas de cinco animais adultos, as quais foram dissecadas, lavadas em solução salina e fragmentadas (1 a 3 mm³). Parte dos fragmentos foi destinada ao grupo controle fresco, e os demais aos grupos experimentais submetidos ao cultivo organotípico procedido por 14 dias a 34 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Foram testados três diferentes meios de cultivo: meio essencial modificado por Dulbecco (DMEM), meio essencial mínimo (MEM) e DMEM suplementado de nutrientes (DMEM/F12). A troca completa dos meios ocorreu a cada três dias, totalizando 5 trocas ao longo do experimento. Os fragmentos foram avaliados aos 7 e aos 14 dias quanto à viabilidade por sondas fluorescentes (Hoechst 33358 e iodeto de propídio), e quanto à integridade do DNA por meio do laranja de acridina em associação ao brometo de etídio. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, avaliados pelos testes de Tukey e Sidak, utilizando o software GraphPad Prism[®] versão 9.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), com $p < 0,05$. No grupo fresco, observou-se viabilidade celular de $89,80 \pm 3,01\%$, com $79,80 \pm 11,20\%$ de integridade do DNA. No 7º dia, os valores de viabilidade nos meios F12, MEM e DMEM foram de $46,40 \pm 2,87\%$, $52,40 \pm 5,49\%$ e $46,60 \pm 2,25\%$, enquanto a integridade do DNA foi de $42,60 \pm 5,76\%$, $48,40 \pm 2,86\%$ e $51,00 \pm 3,11\%$ respectivamente. No 14º dia, a redução persistiu, com valores de viabilidade de $39,80 \pm 3,68\%$, $40,60 \pm 5,66\%$ e $39,80 \pm 4,47\%$, com integridade de DNA em torno de $35,40 \pm 4,99\%$, $42,40 \pm 5,18\%$ e $35,00 \pm 1,70\%$, respectivamente para F12, MEM e DMEM. Ao se comparar a viabilidade celular e a integridade do DNA do grupo fresco com as células cultivadas, verificou-se uma redução significativa ao longo do tempo em todos os meios de cultivo ($P < 0,05$). Porém, não foram detectadas diferenças entre os três meios no tocante à manutenção dos parâmetros avaliados. De modo geral, acredita-se que a composição nutritiva dos três meios seja igualmente adequada à manutenção celular no decorrer do cultivo *in vitro* pelo período de 14 dias, porém outros parâmetros celulares necessitam ser melhor investigados. Ao momento, pode-se concluir que os meios MEM, DMEM e DMEM/F12 são igualmente adequados para o cultivo organotípico de tecido testicular de catetos adultos. No entanto, recomenda-se a utilização do meio essencial mínimo (MEM), uma vez que apresenta um custo de aquisição mais acessível.

Palavras-chave: biobanco, tecido gonadal, espermatogênese, meio de cultura.

Financiamento: CAPES, CNPq

Effect of different media on cell viability and DNA integrity in testicular tissue of adult collared peccaries during organotypic culture

Tayná Moura Matos¹ *, Andréia Maria da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Lilian Leal Danta¹, Romário Parente dos Santos¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Animal Germplasm Conservation Laboratory, UFERSA, Mossoró, Brazil

*E-mail: taynamouramatos@gmail.com

In recent years, testicular tissue technology has emerged as an effective alternative for the conservation of male germplasm, since it would allow an unlimited stock of spermatogonia and, consequently, spermatozoa for application in other biotechnologies. In parallel to the advances in cryopreservation protocols, it is necessary to develop strategies for using that germplasm through *in vitro* culture, the success of which can be influenced by different factors, such as the age of the animal and the medium used. The present study aimed to compare different media (DMEM, MEM and DMEM/F12) used in the *in vitro* organotypic culture of testicular tissue from adult collared peccaries (*Pecari tajacu*). It should be noted that collared peccaries are wild animals of great ecological importance, whose populations are declining in some biomes such as the Caatinga and the Atlantic Forest. The procedures were authorized by the UFERSA Ethics Committee (Opinion no. 24/2023), with SISBIO authorization no. 72170-3. Thus, after euthanasia, the gonads of five adult animals were collected, dissected, washed in saline solution and fragmented (1 to 3 mm³). Part of the fragments was allocated to the fresh control group, and the rest to the experimental groups subjected to organotypic culture for 14 days at 34 °C, in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Three different culture media were tested: Dulbecco's modified essential medium (DMEM), minimum essential medium (MEM) and DMEM supplemented with nutrients (DMEM/F12). The complete change of media occurred every three days, totaling 5 changes throughout the experiment. The fragments were evaluated at 7 and 14 days for viability using fluorescent probes (Hoechst 33358 and propidium iodide), and for DNA integrity using acridine orange in association with ethidium bromide. Data were expressed as mean ± standard error, evaluated by Tukey and Sidak tests, using GraphPad Prism® software version 9.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), with $p < 0.05$. In the fresh group, cell viability of $89.80 \pm 3.01\%$ was observed, with $79.80 \pm 11.20\%$ DNA integrity. On the 7th day, the viability values in the DEM/F12, MEM and DMEM media were $46.40 \pm 2.87\%$, $52.40 \pm 5.49\%$ and $46.60 \pm 2.25\%$, while DNA integrity was $42.60 \pm 5.76\%$, 48.40 ± 2.86 and 51.00 ± 3.11 respectively. On the 14th day, the reduction persisted, with viability values of $39.80 \pm 3.68\%$, $40.60 \pm 5.66\%$ and $39.80 \pm 4.47\%$, with DNA integrity around $35.40 \pm 4.99\%$, $42.40 \pm 5.18\%$ and $35.00 \pm 1.70\%$, respectively for DEM/F12, MEM and DMEM. When comparing the cell viability and DNA integrity of the fresh group with the cultured cells, a significant reduction was observed over time in all culture media ($P < 0.05$). However, no differences were detected between the three media regarding the maintenance of the evaluated parameters. In general, it is believed that the nutritional composition of the three media is equally adequate for cell maintenance during *in vitro* culture for a period of 14 days, however other cellular parameters need to be further investigated. At present, it can be concluded that MEM, DMEM and DMEM/F12 media are equally suitable for the organotypic culture of testicular tissue from adult collared peccaries. However, the use of minimum essential medium (MEM) is recommended, since it has a more affordable acquisition cost.

Keywords: biobank, gonadal tissue, spermatogenesis, culture medium.

Financial support: CAPES, CNPq

Espermatozoides subdesenvolvidos em jararaca-caiçaca *Bothrops moojeni*: relato de caso

Teresinha Inês de Assumpção¹, Heloísa Castro Pereira², André Luiz Quagliatto Santos², Jéssica Santos Queiroz³

¹Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, ²ONG PAS DO BRASIL/PPGCVET-UFU, ³
Doutoranda PPGCVET-UFU
E-mail: teassumpcao@ufu.br

A jararaca-caiçaca, *Bothrops moojeni*, pertence à classe Reptilia, ordem Squamata, família Viperidae. É uma das serpentes mais comuns do Brasil e ocorre, principalmente, no centro-oeste e sudeste do Brasil, habitando campos e cerrados. Sua longevidade é em média de 15 anos. A *B. moojeni* é uma serpente peçonhenta, com veneno de grande capacidade hemorrágica, proteolítica, coagulante e necrosante. O período reprodutivo da jararaca é sazonal, com os acasalamentos ocorrendo de março a maio. Com o objetivo de selecionar os reprodutores em um trabalho de campo, foram utilizados animais da espécie *B. moojeni*, que se encontravam em cativeiro em uma central de captação de peçonha na cidade de Uberlândia. Foram avaliados 18 machos da espécie *B. moojeni* antes do período de coberturas (mês de janeiro). Os animais tinham entre 2 e 3 anos de idade. Para a coleta do sêmen, os animais foram contidos fisicamente em tubos plásticos próprios, feita limpeza da região cloacal com soro fisiológico, em seguida o animal recebeu anestesia local em quatro pontos da cloaca com lidocaína a 1% na dose de 15mg/kg e após 20 minutos foi realizada a coleta por massagem abdominal na região ventral do terço final do animal. A coleta do sêmen foi feita em micro eppendorfs com a ajuda de pipeta automática de 10 µl. As análises morfológicas do sêmen foram realizadas por microscopia de contraste de fase em 200 células espermáticas. Verificou-se que quatro animais (22,3% dos espécimes) apresentaram 100% das células espermáticas com cabeças subdesenvolvidas e com formação normal das caudas. Estas células foram comparadas com células normais de outros animais da mesma espécie. Não foram encontrados outros tipos celulares na análise do sêmen. A literatura específica não relata nada semelhante ao que foi identificado nessa análise e ainda não há uma explicação para o fato. Em continuidade, serão realizadas outras análises destas células em microscopia eletrônica e histologia do testículo para melhor entender este caso. Ainda são necessárias pesquisas com andrologia de serpentes a fim de entender as alterações nas características morfológicas dos espermatozoides e o efeito na fertilidade dos reprodutores da espécie.

Palavras-chave: serpentes, reprodução, sêmen, morfologia espermática.

Undersdeveloped spermatozoa in the brazilian lancehead *Bothrops moojeni*: a case report

Teresinha Inês de Assumpção¹, Heloísa Castro Pereira², André Luiz Quagliatto Santos², Jéssica Santos Queiroz³.

¹Animal Reproduction Laboratory, Federal University of Uberlândia, ²NGO PAS DO BRASIL/PPGCVET-UFU, ³PhD student PPGCVET-UFU
E-mail: teassumpcao@ufu.br

The brazilian lancehead, *Bothrops moojeni*, belongs to the class Reptilia, order Squamata, and family Viperidae. It is one of the most common snakes in Brazil, primarily found in the central-western and southeastern regions, inhabiting grasslands and savannas. Its average lifespan is 15 years. *B. moojeni* is a venomous snake with a highly hemorrhagic, proteolytic, coagulant, and necrotizing venom. The reproductive period of this species is seasonal, with mating occurring from March to May. For a field study aimed at selecting breeding stock, captive *B. moojeni* specimens from a venom collection center in Uberlândia, Brazil, were used. Eighteen male *B. moojeni* were evaluated prior to the breeding season (January). The animals were aged 2–3 years. For semen collection, individuals were physically restrained in specialized plastic tubes. The cloacal region was cleaned with saline solution, followed by local anesthesia at four cloacal points using 1% lidocaine (15 mg/kg). After 20 minutes, semen was collected via abdominal massage on the ventral region of the posterior third of the body. Semen was collected in microcentrifuge tubes using a 10 µl automatic pipette. Sperm morphology was analyzed via phase-contrast microscopy, evaluating 200 sperm cells per sample. Four specimens (22.3% of the sample) exhibited 100% of sperm cells with underdeveloped heads and normally formed tails. These cells were compared to normal sperm from other conspecifics. No other cell types were observed in the semen analysis. Current literature does not report similar findings, and no explanation for this phenomenon exists yet. Further analyses, including electron microscopy and testicular histology, will be conducted to investigate this case. Additional research on snake andrology is necessary to understand alterations in sperm morphology and their implications for breeder fertility in this species.

Keywords: snakes, reproduction, semen, sperm morphology.

Integridade acrossomal, mitocondrial e de membrana plasmática de espermatozoides epididimários de *Rusa unicolor* criopreservados com diferentes diluidores

Isabella de Matos Brandão Carneiro^{1*}, Rodrigo Freitas Bittencourt³, Máira Planzo Fernandes³, Eduardo Oliveira Costa¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes², Esther Kayla dos Santos Matos¹, Rafaella Sanches de Jesus², Antonia de Castro Vega², Sidney Gonçalves Gonzalez Alves⁴

¹Aluno de Pós-graduação da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal Bahia (EMVZ-UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; ²Graduando do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ³Docente do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ⁴Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil

*E-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

A criopreservação é essencial para a conservação do material genético, mas pode causar injúrias às membranas dos espermatozoides, com impactos na viabilidade das células. Avaliar tais estruturas é crucial para otimizar protocolos de biotecnologias reprodutivas que visem a conservação de espécies ameaçadas, como *Rusa unicolor*. Este estudo teve como objetivo avaliar a integridade mitocondrial e das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides epididimários de *Rusa unicolor* submetidos à criopreservação em diferentes diluidores. Foram utilizados espermatozoides coletados de quatro machos provenientes do Parque Zoobotânico de Salvador, Bahia, submetidos à orquiectomia bilateral para controle populacional. A técnica utilizada para a recuperação dos espermatozoides foi a de slicing e flutuação em TRIS-gema de ovo, sendo realizada imediatamente após a orquiectomia, em temperatura ambiente. As amostras foram avaliadas e criopreservadas empregando diferentes diluidores a base de Tris-gema de ovo: GL3% e GL 6% contendo 3% e 6% de glicerol e DMA3% e DMA6% com 3% e 6% de Dimetilformamida (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil). As amostras foram resfriadas a 5°C (0,47°C/min) por duas horas, e em seguida transferidas para uma caixa de isopor (37 L) contendo nitrogênio líquido (N₂L) a 5 cm de altura, onde permaneceram por 20 minutos. Após esse período, as amostras foram submersas em N₂L a -196°C, e posteriormente descongeladas a 37°C/30 segundos. A integridade da membrana plasmática foi avaliada por microscopia de epifluorescência, utilizando sondas fluorescentes: o diacetato de carboxifluoresceína (DIC; n. 21879, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e iodeto de propídeo (IP; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). Os espermatozoides foram classificados como apresentando membrana íntegra (DIC+/IP-) ou lesada (DIC-/IP+). A integridade acrossomal foi avaliada com Pisum sativum agglutinin conjugado à isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), sendo os espermatozoides classificados como lesados (PSA+/IP+) ou não lesados (PSA-/IP+). A atividade mitocondrial foi avaliada pela incubação de 10 µL de cada amostra com 10 µL de solução de trabalho de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), segundo classificação de Hrudka (1987) que leva em consideração a deposição do corante na peça intermediária: classe I (peça intermediária totalmente corada); classe II (≥50% da peça intermediária corada); classe III (≤50% da peça intermediária corada); classe IV (ausência de coloração da peça intermediária). Os dados foram analisados no GraphPad Prism 9 versão 9.5.0, utilizando o teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. Na análise da integridade da membrana plasmática, os grupos GL 3% e GL 6% apresentaram maior proporção de espermatozoides não lesados (IP-/DIC+), ambos com mediana de 22,0%, quando comparados aos grupos DMA (P < 0,05). Em concordância, os grupos DMA 3% e DMA 6% apresentaram as maiores proporções de células lesadas (IP+/DIC-), com medianas de 88,0% e 87,0%, respectivamente, valores significativamente superior aos observados nos grupos GL 3% e GL 6% (P < 0,05). Quanto à integridade acrossomal (IP+/PSA+), os grupos GL 3% e GL 6% mantiveram maiores proporções de acrossomos íntegros (63,0% e 67,0%, respectivamente), com valores estatisticamente superiores aos dos grupos DMA 3% (40,0%) e DMA 6% (42,0%) (P < 0,05). Na avaliação da atividade mitocondrial, os grupos DMA 3% e DMA 6% apresentaram as maiores proporções de células grau I (48,0% e 44,0%, respectivamente), diferindo significativamente dos grupos GL 3% (20,0%) e GL 6% (21,0%) (P < 0,05). Para as classes II e III, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos (P > 0,05). Já na classe IV, o grupo DMA 3% apresentaram a menor proporção de células sem coloração na peça intermediária (4,0%), enquanto o grupo GL 6% exibiram a maior mediana (11,0%), com diferença significativa entre os tratamentos (P < 0,05). Conclui-se que os diluentes testados apresentaram desempenhos distintos conforme o parâmetro avaliado. Os diluentes com glicerol foram mais eficazes na preservação das membranas plasmática e acrossomal, enquanto os com dimetilformamida favoreceram maior proporção de espermatozoides com alta atividade mitocondrial máxima. Estudos com um número maior de animais são recomendados para consolidar essas evidências e avançar na padronização de protocolos de criopreservação para *Rusa unicolor*.

Palavras-chave: Cervo sambar, crioprotetores, fluorescência, integridade estrutural.

Acrosomal, mitochondrial, and plasma membrane integrity of *Rusa unicolor* epididymal spermatozoa cryopreserved with different diluents

Isabella de Matos Brandão Carneiro^{1*}, Rodrigo Freitas Bittencourt³, Máira Planzo Fernandes³, Eduardo Oliveira Costa¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes², Esther Kayla dos Santos Matos¹, Rafaella Sanches de Jesus², Antonia de Castro Vega², Sidney Gonçalves Gonzalez Alves⁴

¹Postgraduate student of the School of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the Federal University of Bahia (EMVZ-UFBA), Salvador, Bahia, Brazil; ²Graduating from the Veterinary Medicine course of EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ³ Professor of the Veterinary Medicine course of EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ⁴Veterinarian at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA

Brazil

*Email: isabella.brandao.c@hotmail.com

Cryopreservation is essential for the preservation of genetic material, but it can cause damage to sperm membranes, impacting cell viability. Evaluating such structures is crucial to optimize reproductive biotechnology protocols aimed at the conservation of endangered species, such as *Rusa unicolor*. This study aimed to evaluate the mitochondrial integrity and the plasma and acrosomal membranes of epididymal sperm of *Rusa unicolor* submitted to cryopreservation in different extenders. Sperm were collected from four males from the Zoobotanical Park of Salvador, Bahia, who underwent bilateral orchiectomy for population control. The technique used to recover sperm was slicing and flotation in TRIS-egg yolk, performed immediately after orchiectomy, at room temperature. The samples were evaluated and cryopreserved using different Tris-egg yolk-based extenders: GL3% and GL 6% containing 3% and 6% glycerol and DMA3% and DMA6% with 3% and 6% dimethylformamide (Cromaline Química Fina, São Paulo, Brazil). The samples were cooled to 5°C (0.47°C/min) for two hours and then transferred to a Styrofoam box (37 L) containing liquid nitrogen (N₂L) at a height of 5 cm, where they remained for 20 minutes. After this period, the samples were submerged in N₂L at -196°C and subsequently thawed at 37°C/30 seconds. Plasma membrane integrity was assessed by epifluorescence microscopy using fluorescent probes: carboxyfluorescein diacetate (CID; no. 21879, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States) and propidium iodide (PI; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States). Sperm were classified as having an intact (CID+/PI-) or damaged (CID-/PI+) membrane. Acrosomal integrity was assessed with Pisum sativum agglutinin conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States), and sperm were classified as damaged (PSA+/PI+) or undamaged (PSA-/PI+). Mitochondrial activity was assessed by incubating 10 µL of each sample with 10 µL of 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, United States) working solution, according to the classification of Hrudka (1987) that takes into account the deposition of the dye in the intermediate piece: class I (completely stained intermediate piece); class II (≥50% of the stained intermediate piece); class III (≤50% of the stained intermediate piece); class IV (absence of staining of the intermediate piece). Data was analyzed in GraphPad Prism 9 version 9.5.0, using the Kruskal-Wallis test, with a significance level of 5%. In the analysis of plasma membrane integrity, the GL 3% and GL 6% groups showed a higher proportion of undamaged sperm (IP-/DIC+), both with a median of 22.0%, when compared to the DMA groups (P < 0.05). In agreement, the DMA 3% and DMA 6% groups presented the highest proportions of injured cells (IP+/DIC-), with medians of 88.0% and 87.0%, respectively, values significantly higher than those observed in the GL 3% and GL 6% groups (P < 0.05). As for acrosomal integrity (IP+/PSA+), the GL 3% and GL 6% groups maintained higher proportions of acrosomes intact (63.0% and 67.0%, respectively), with values statistically higher than those of the DMA 3% (40.0%) and DMA 6% (42.0%) groups (P < 0.05). In the evaluation of mitochondrial activity, the DMA 3% and DMA 6% groups presented the highest proportions of grade I cells (48.0% and 44.0%, respectively), differing significantly from the GL 3% (20.0%) and GL 6% (21.0%) groups (P < 0.05). For classes II and III, no statistical differences were observed between the groups (P > 0.05). In class IV, the DMA 3% group presented the lowest proportion of cells without staining in the intermediate piece (4.0%), while the GL 6% group exhibited the highest median (11.0%), with a significant difference between treatments (P < 0.05). It is concluded that the tested diluents presented distinct performances according to the evaluated parameter. The diluents with glycerol were more effective in preserving plasma and acrosomal membranes, while those with dimethylformamide favored a higher proportion of spermatozoa with high maximum mitochondrial activity. Studies with a larger number of animals are recommended to consolidate this evidence and advance the standardization of cryopreservation protocols for *Rusa unicolor*.

Keywords: Deer sambar, cryoprotectors, fluorescence, structural integrity.

Morfologia e cinética espermática de espermatozoides epididimários de *Rusa unicolor* refrigerados por 24 horas a 5 °C e submetidos à criopreservação em diferentes diluidores.

Isabella de Matos Brandão Carneiro^{1*}, Rodrigo Freitas Bittencourt³, Máira Planzo Fernandes³, Eduardo Oliveira Costa¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes², Esther Kayla dos Santos Matos¹, Rafaella Sanches de Jesus², Antonia de Castro Vega², Sidney Gonçalves Gonzalez Alves⁴

¹Aluno de Pós-graduação da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal Bahia (EMVZ-UFBA), Salvador, Bahia, Brasil; ²Graduando do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ³Docente do curso de Medicina Veterinária da EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brasil; ⁴Médico Veterinário da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brasil

*E-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

A recuperação de espermatozoides epididimários associada à criopreservação constitui uma estratégia promissora para a conservação de germoplasma em espécies ameaçadas, como o cervo sambar (*Rusa unicolor*). Nesse contexto, a refrigeração do complexo testículo-epidídimo por 24h, representa uma alternativa viável para o transporte até um centro de referência, em condições de processamento e formação de banco de sêmen criopreservado, especialmente em situações em que a criopreservação imediata não é possível e após óbitos em ambientes *in situ* ou mesmo atropelados pelo avanço da urbanização. Este estudo teve como objetivo comparar a eficiência de diferentes diluidores na criopreservação de espermatozoides oriundos de epidídimos refrigerados por 24h. Para o estudo, foram utilizados os complexos testículo-epidídimo de quatro cervídeos machos da espécie *Rusa unicolor*, coletados após orquiectomia bilateral, estratégia usada para controle populacional e manejo do plantel. Após a orquiectomia, os complexos testículos-epidídimo foram armazenados por 24 horas a 5 °C em geladeira (Minitube, Porto Alegre, Brasil) para posterior processamento. Para o processamento das amostras, os complexos foram lavados com ringer lactato e a cauda do epidídimo isolada do testículo, para procedimento de recuperação de espermatozoides utilizando a técnica de fatiamento e flutuação. Para criopreservação foram utilizados meio comercial e meio base de Tris-gema acrescido de glicerol e dimetilacetamida, formando os grupos experimentais: G1 (GLI 3%) contendo 3% de glicerol (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil); G2 (GLI 6%), contendo 6% de glicerol; G3 (DMA3%) com 3% de N-N. Dimetilacetamida-DMA (Cromaline química fina, São Paulo, Brasil) e G4 (DMA6%) com 6% de DMA. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL com concentração de 60x10⁶sptz por palheta e resfriadas a 5°C (0,47°C/min) por duas horas. Em seguida, foram transferidas para uma caixa de isopor (37 L) contendo nitrogênio líquido (N₂L) a 5 cm de altura, onde permaneceram por 20 minutos sob vapor. Posteriormente, as palhetas foram submersas em N₂L (-196 °C) e, no momento do uso, descongeladas a 37 °C por 30 segundos. Na sequência, as amostras foram avaliadas quanto a morfologia pela técnica de esfregaço em lâmina corada por panóptico e analisada no aumento de 1.000x em microscópio de contraste de fase e à cinética espermática por sistema automatizado (CASA, Microptics, S.L. Versão 5.1, Barcelona, Espanha), com set-up para cervídeos. As variáveis analisadas incluíram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), linearidade (LIN, %), retidão (STR, %), oscilação (WOB, %), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s), velocidade média do caminho (VAP, µm/s) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm/s). As análises dos dados foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 9 versão 9.5.0 com nível de significância de 5%. Não houve diferença significativa na preservação da morfologia espermática entre os diferentes diluidores (P>0,05). A motilidade total (MT) e a motilidade progressiva (MP) foram superiores nos grupos com glicerol em comparação aos grupos com DMA (P>0,05). A MT variou de apenas 0,2% no grupo G4, 5,7% no G3, 24,7% no G1 e 33,3% no grupo G2. Já a MP foi diferente de 0% apenas nos grupos com glicerol, com valores de 7,3% no G1 e 14,3% no G2. Parâmetros de velocidade também indicaram superioridade estatística dos grupos com glicerol, com G2 apresentando VCL (60,0 µm/s), VSL (34,4 µm/s) e VAP (24,4 µm/s), G1 apresentou VCL (45,7 µm/s), VSL (20,4 µm/s) e VAP (17,4 µm/s), enquanto o grupo G3 obteve VCL (21,4 µm/s), VSL (8,5 µm/s) e VAP (5,1 µm/s). No grupo G4, os valores foram ainda menores, com VCL (12,4 µm/s), VSL (3,7 µm/s) e VAP (2,6 µm/s). A frequência de batimento da cauda (BCF) foi mais alta nos grupos com glicerol (ambos com 8,5 Hz), com diferença estatística significativa em relação ao G3 (2,5 Hz) e G4 (1,0 Hz) (P<0,05). A linearidade (LIN) e a retilinearidade (STR) também foram superiores no G2 (68,0% e 37,0%, respectivamente), com diferença estatística significativa em relação ao G3 (44,1% e 10,5) para ambos os parâmetros (P<0,05). A amplitude lateral da cabeça (ALH) foi mais elevada no G1 (2,5 µm), significativamente diferente do G3 (0,7 µm). A criopreservação dos espermatozoides de *Rusa unicolor*, colhidos após 24 horas de refrigeração do complexo testículo-epidídimo, em meio a base de gema de ovo e glicerol foram, em geral, mais eficazes para preservação da viabilidade dos espermatozoides, em comparação aos meios contendo DMA como crioprotetor.

Palavras-chave: Cervo sambar, biobancos, crioprotetores, conservação.

Sperm morphology and kinetics of epididymal spermatozoa of *Rusa unicolor* refrigerated for 24 hours at 5°C and subjected to cryopreservation in different extenders

Isabella de Matos Brandão Carneiro^{1*}, Rodrigo Freitas Bittencourt³, Máira Planzo Fernandes³, Eduardo Oliveira Costa¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes², Esther Kayla dos Santos Matos¹, Rafaella Sanches de Jesus², Antonia de Castro Vega², Sidney Gonçalves Gonzalez Alves⁴

¹Postgraduate student of the School of Veterinary Medicine and Zootecnics of the Federal University of Bahia (EMVZ-UFBA), Salvador, Bahia, Brazil; ²Graduating from the Veterinary Medicine course of EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ³Professor of the Veterinary Medicine course of EMEVZ-UFBA, Salvador, Bahia, Brazil; ⁴Veterinarian at the School of Veterinary Medicine and Animal Science of UFBA - EMEVZ-UFBA, Salvador, BA, Brazil

*E-mail: isabella.brandao.c@hotmail.com

Epididymal sperm recovery associated with cryopreservation is a promising strategy for germplasm conservation in endangered species, such as the sambar deer (*Rusa unicolor*). In this context, refrigeration of the testis-epididymis complex for 24 hours represents a viable alternative for transport to a reference center, under conditions of processing and formation of a cryopreserved semen bank, especially in situations where immediate cryopreservation is not possible and after deaths in *in situ* environments or even after being run over by the advance of urbanization. This study aimed to compare the efficiency of different extenders in the cryopreservation of sperm from epididymis refrigerated for 24 hours. For the study, the testis-epididymis complexes of four male deer of the species *Rusa unicolor* were used, collected after bilateral orchiectomy, a strategy used for population control and herd management. After orchiectomy, the testis-epididymis complexes were stored for 24 hours at 5 °C in a refrigerator (Minitube, Porto Alegre, Brazil) for later processing. For sample processing, the complexes were washed with Ringer's lactate and the tail of the epididymis was isolated from the tests for sperm recovery using the slicing and flotation technique. Commercial medium and Tris-yolk base medium with glycerol and dimethylacetamide were used for cryopreservation, forming the experimental groups: G1 (GLI 3%) containing 3% glycerol (Cromaline Química Fina, São Paulo, Brazil); G2 (GLI 6%), containing 6% glycerol; G3 (DMA3%) with 3% N-N. Dimethylacetamide-DMA (Cromaline Química Fina, São Paulo, Brazil); and G4 (DMA6%) with 6% DMA. The samples were packaged in 0.25 mL reeds with a concentration of 60x10⁶sptz per straw and cooled at 5°C (0.47°C/min) for two hours. They were then transferred to a Styrofoam box (37 L) containing liquid nitrogen (N₂L) at a height of 5 cm, where they remained under steam for 20 minutes. Subsequently, the reeds were submerged in N₂L (-196°C) and, at the time of use, defrosted at 37°C for 30 seconds. The samples were then evaluated for morphology by the smear technique on a panoptic-stained slide and analyzed at 1,000x magnification under a phase contrast microscope, and for sperm kinetics using an automated system (CASA, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain), with a set-up for cervids. The variables analyzed included: total motility (MT, %), progressive motility (MP, %), linearity (LIN, %), straightness (STR, %), oscillation (WOB, %), curvilinear velocity (VCL, µm/s), straight-line velocity (VSL, µm/s), mean path velocity (VAP, µm/s) and amplitude of lateral head displacement (ALH, µm/s). Data analyses were performed using GraphPad Prism 9 version 9.5.0 with a significance level of 5%. There was no significant difference in the preservation of sperm morphology between the different extenders (P>0.05). Total motility (MT) and progressive motility (MP) were higher in the glycerol groups compared to the DMA groups (P>0.05). MT varied from only 0.2% in group G4, 5.7% in G3, 24.7% in G1 and 33.3% in group G2. MP was different from 0% only in the groups with glycerol, with values of 7.3% in G1 and 14.3% in G2. Velocity parameters also indicated statistical superiority of the groups with glycerol, with G2 presenting VCL (60.0 µm/s), VSL (34.4 µm/s) and VAP (24.4 µm/s), G1 presented VCL (45.7 µm/s), VSL (20.4 µm/s) and VAP (17.4 µm/s), while group G3 obtained VCL (21.4 µm/s), VSL (8.5 µm/s) and VAP (5.1 µm/s). In group G4, the values were even lower, with VCL (12.4 µm/s), VSL (3.7 µm/s) and VAP (2.6 µm/s). Tail beat frequency (BCF) was higher in the glycerol groups (both 8.5 Hz), with a statistically significant difference in relation to G3 (2.5 Hz) and G4 (1.0 Hz) (P<0.05). Linearity (LIN) and rectilinearity (STR) were also higher in G2 (68.0% and 37.0%, respectively), with a statistically significant difference in relation to G3 (44.1% and 10.5) for both parameters (P<0.05). Lateral head amplitude (ALH) was higher in G1 (2.5 µm), significantly different from G3 (0.7 µm). Cryopreservation of *Rusa unicolor* sperm, collected after 24 hours of refrigeration from the testis-epididymis complex, in a medium based on egg yolk and glycerol was, in general, more effective for preserving sperm viability, compared to media containing DMA as a cryoprotectant.

Keywords: Deer sambar, biobanks, cryoprotectors, conservation

Morfologia espermática de anta-brasileira (*Tapirus terrestris*) adulta: relato de caso

Luiz Eduardo Kneese de Camargo Fidelis^{1,2}, Maitê Cardoso Coelho da Silva^{1,2}, Eliane Vianna da Costa e Silva¹, Alexia Pimenta Bom Conselho^{2,3}, Ian Figueiredo Navarezi^{1,2}, Larissa Brandão Souza Schneider^{1,2}, Liandra Martiliano Gaeth^{1,2}, Pedro Nacib Jorge-Neto^{2,3}, Gustavo Guerino Macedo¹, Thyara de Deco Souza Araujo^{1,2}, Gediendson Ribeiro de Araujo^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil.

²Instituto Reprocon, Campo Grande, MS, Brasil. ³Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

* e-mail: gediendson@gmail.com

A anta-brasileira (*Tapirus terrestris*), classificada como vulnerável à extinção pela IUCN, desempenha um papel essencial na preservação dos ecossistemas brasileiros, principalmente através da dispersão de sementes. A análise da morfologia espermática constitui um passo essencial na avaliação andrológica, particularmente em espécies selvagens cujas características reprodutivas são pouco exploradas. Este conhecimento é um dos primeiros passos para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas, especialmente em espécies ameaçadas. O presente estudo teve como objetivo investigar a morfologia espermática de um macho adulto de três anos, encaminhado ao Centro de Reabilitação de Animais Silvestres em Campo Grande/MS para tratamento de uma lesão no membro posterior. A colheita farmacológica de sêmen foi realizada por cateterização uretral após sedação, utilizando cloridrato de medetomidina (0,08 mg/kg, i.m.) combinado com cetamina (4 mg/kg, i.m.), aplicadas por um dardo disparado através de zarabatana. As amostras de sêmen foram avaliadas via microscopia de contraste diferencial de interferência (ampliação de $\times 1.000$), avaliando o total de 100 células e classificando as anormalidades em defeitos maiores e menores segundo padrões utilizados em bovinos. Os resultados mostraram que 91% dos espermatozoides apresentaram anormalidades, com 89% considerados defeitos maiores e 2% menores. Principais alterações incluíram gota citoplasmática proximal (38%), defeito de Dag (18%) e cauda fortemente dobrada/enrolada (13%). Outras anormalidades observadas foram cauda dobrada com gota distal (8%), peça intermediária encurvada (4%), pseudogota (4%), peça intermediária em saca-rolha (3%), cauda enrolada na cabeça (1%), cauda dobrada simples (1%) e gota citoplasmática distal (1%). Apenas 9% das células apresentaram morfologia normal, sugerindo um comprometimento andrológico significativo dentro dos padrões bovinos. Entretanto, é importante considerar que anormalidades consideradas críticas em espécies domésticas podem não ter as mesmas implicações em espécies selvagens devido a variações biológicas. Ao comparar com equinos (*Equus caballus*), que compartilham a mesma ordem e classe (Perissodactyla), não foram encontradas semelhanças significativas nas porcentagens de células normais e defeituosas, nem nos tipos de patologias espermáticas entre as duas espécies, apesar de algumas semelhanças nas frações do ejaculado. Esses achados destacam a necessidade de desenvolver protocolos específicos para colheita, análise e conservação do sêmen da anta-brasileira, sugerindo que as alterações observadas podem estar associadas a traumas anteriores que justificaram o encaminhamento do animal ao centro de reabilitação.

Palavras-chave: patologias espermáticas, espermograma, conservação, One Conservation.

Agradecimentos: Ao CRAS-MS. O presente trabalho foi realizado com apoio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC – Brasil. O presente trabalho foi financiado em parte pelo Instituto Reprocon.