

## A adição do antioxidante astaxantina em meios de criopreservação de sêmen bovino melhora a qualidade espermática pós-descongelção?

Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho<sup>2</sup>, Ana Paula Pinoti Pavaneli<sup>3</sup>, Felipe Casellato Antonioli<sup>2</sup>, Rafael Cuel Bortoletto<sup>2</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, José Antonio Dell'Aqua Junior<sup>4</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>5</sup>, Lindsay Unno Gimenes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos - LATES, Universidade de São Paulo – USP; <sup>4</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Universidade de São Paulo – USP.

\*E-mail: Lindsay.gimenes@unesp.br

A astaxantina, antioxidante relatado como duas vezes mais eficaz que o  $\beta$ -caroteno na prevenção da peroxidação lipídica, tem uma estrutura molecular que lhe possibilita permanecer tanto dentro quanto fora da membrana celular. Sua cadeia de polieno aprisiona os radicais na membrana celular, enquanto o anel terminal da astaxantina pode eliminar os radicais nas partes externa e interna da membrana celular. Deste modo, a hipótese do presente estudo é que a adição de astaxantina em diluidores reduz o estresse oxidativo e, desta forma, preserva a motilidade espermática, a integridade de membranas, e o potencial mitocondrial no processo de criopreservação. Com isso, objetivou-se avaliar a suplementação de astaxantina aos diluidores à base de gema de ovo (GEMA; BotuBov<sup>®</sup> - Experimento 1) e à base de lipossomas (LIPO; Optidux<sup>®</sup> - Experimento 2), na criopreservação espermática, quanto à motilidade, morfologia, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo em espermatozoides bovinos. Foram utilizados seis touros da raça Nelore e sete ejaculados de cada animal. Cada ejaculado foi dividido para receber os seguintes tratamentos: diluidor comercial (C-GEMA ou C-LIPO), diluidor comercial suplementado com 0,5  $\mu$ M de astaxantina (GEMA + AST ou LIPO + AST) e diluidor comercial com 0,009% de dimetilsulfóxido (C-GEMA DMSO ou C-LIPO DMSO). Este último grupo foi incluído como um segundo controle negativo, uma vez que o DMSO foi a substância utilizada para dissolver a astaxantina. A diluição foi realizada na concentração de  $40 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Foram utilizadas palhetas de 0,25 mL e as células foram criopreservadas com auxílio de máquina de criopreservação automatizada. Após a criopreservação, as células espermáticas foram avaliadas para características de motilidade por meio do sistema computadorizado da motilidade espermática (*Computer Assisted Sperm Analysis* - CASA) e morfologia espermática sob microscopia de contraste de interferência diferencial, classificando os defeitos em maiores, menores e totais. Além disso, foi mensurada a porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras, potencial de membrana mitocondrial e estresse oxidativo, por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e foram analisados por ANOVA, utilizando modelo misto (PROC MIXED), considerando o efeito aleatório do ejaculado de cada touro e os efeitos fixos de tratamento, touro e interação. No experimento 1, os espermatozoides dos grupos C-GEMA, GEMA + AST e C-GEMA DMSO apresentaram, respectivamente, os seguintes resultados: velocidade progressiva (VSL)  $79,2^a \pm 1,3$ ,  $75,3^b \pm 1,3$  e  $75,4^b \pm 1,3$  ( $P = 0,02$ ); frequência de batimento (BCF)  $32,7^a \pm 0,4$ ,  $30,9^b \pm 0,4$  e  $31,3^b \pm 0,4$  ( $P < 0,01$ ); retilinearidade (STR)  $88,9^a \pm 0,3$ ,  $87,3^b \pm 0,4$  e  $87,5^b \pm 0,4$  ( $P < 0,01$ ); defeitos menores  $2,4^b \pm 0,3$ ,  $3,2^a \pm 0,3$  e  $2,2^b \pm 0,2$  ( $P = 0,01$ ); e intensidade média do potencial de membrana mitocondrial  $9796,1^a \pm 495,5$ ,  $8028,3^b \pm 441,3$  e  $8732,8^{ab} \pm 370,7$  ( $P = 0,04$ ). As demais características não diferiram entre os grupos ( $P > 0,05$ ). De forma inesperada nas características em que a astaxantina foi superior ou inferior ao grupo C-GEMA, os resultados foram semelhantes ao grupo C-GEMA DMSO, indicando que os efeitos observados não foram propiciados pela astaxantina. No experimento 2 não houve diferença entre os tratamentos. Uma vez que a adição de astaxantina aos meios comerciais gerou resultado negativo quando utilizado o diluidor à base de gema de ovo e nulo quando utilizado o diluidor à base de lipossomas, há indícios de que a composição do diluidor possivelmente influencie a célula espermática a requerer ou não a suplementação com o antioxidante astaxantina. As substâncias contidas nos diluidores podem promover efeitos diferentes na célula espermática, em virtude da sua composição ou viscosidade e, talvez, este seja um motivo que dificulta a repetibilidade de resultados de estudos envolvendo antioxidantes. Além disso outra hipótese para nossos resultados é um possível antagonismo entre os antioxidantes presentes nas fórmulas comerciais, cujo tipo de molécula e quantidades não são especificadas, ou a dose de astaxantina utilizada no presente estudo. Com isso, apesar de não ter realizado a comparação entre os diluidores, pode-se inferir que possivelmente eles atuem de formas distintas. Não verificamos em nosso trabalho o efeito protetor da astaxantina contra o estresse oxidativo na dose utilizada, no entanto, é possível que o ajuste da mesma possa causar benefícios. Conclui-se que a astaxantina, na concentração utilizada, quando adicionada aos diluidores comerciais à base de gema de ovo ou lipossomas não reduz o estresse oxidativo e, portanto, não preserva a motilidade espermática e o potencial mitocondrial, rejeitando a hipótese inicial do presente estudo.

**Palavras-chave:** carotenoide, criopreservação, estresse oxidativo, gema de ovo, lipossomas.

**Agradecimentos:** Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD/ZMVs) pela disponibilização do citômetro de fluxo, assim como às empresas Botupharma<sup>®</sup> e Reprodux<sup>®</sup> pelo fornecimento dos diluidores.

## Does the addition of the antioxidant astaxanthin in bovine cryopreservation semen extenders improve post-thaw sperm quality?

Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho<sup>2</sup>, Ana Paula Pinoti Pavaneli<sup>3</sup>, Felipe Casellato Antonioli<sup>2</sup>, Rafael Cuel Bortoletto<sup>2</sup>, André Furugen Cesar de Andrade<sup>3</sup>, José Antonio Dell'Aqua Junior<sup>4</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>5</sup>, Lindsay Unno Gimenes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos - LATES, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>4</sup>Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Botucatu, SP, Brasil. <sup>5</sup>Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, SP, Brasil

\*E-mail: Lindsay.gimenes@unesp.br

Astaxanthin, an antioxidant reported to be twice as effective as  $\beta$ -carotene in preventing lipid peroxidation, has a molecular structure that enables it to remain both inside and outside the cell membrane. Its polyene chain traps free radicals, while the terminal ring of astaxanthin can eliminate them outside and inside of the cell membrane. Thus, the hypothesis of this study is that the addition of astaxanthin in extenders reduces oxidative stress and thus preserves sperm motility, membrane integrity, and mitochondrial potential in the cryopreservation process. The aim of this study was to evaluate the astaxanthin supplementation in egg yolk-based (YOLK; BotuBov<sup>®</sup> - Experiment 1) and liposome-based (LIPO; Optidux<sup>®</sup> - Experiment 2) extenders in sperm cryopreservation, regarding motility, morphology, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial membrane potential and oxidative stress in bovine spermatozoa. Six Nelore bulls and seven ejaculates from each animal were used. Each ejaculate was divided to receive the following treatments: commercial extender (C-YOLK or C-LIPO), commercial extender supplemented with 0.5  $\mu$ M of astaxanthin (YOLK + AST or LIPO + AST) and commercial extender with 0.009% dimethyl sulfoxide (C-YOLK DMSO or C-LIPO DMSO). The last group was included as a second negative control, since DMSO was the substance used to solve the astaxanthin. Dilution was performed at a concentration of  $40 \times 10^6$  sperm/mL. 0.25 mL straws were used and the cells were cryopreserved using an automated cryopreservation machine. After cryopreservation, sperm cells were evaluated for motility characteristics using the *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) and sperm morphology under differential interference contrast microscopy, classifying defects as major, minor and total. In addition, the percentage of cells with intact plasma and acrosomal membranes, mitochondrial membrane potential and oxidative stress were measured by flow cytometry. Results were expressed as mean  $\pm$  standard error and were analyzed by ANOVA, using a mixed model (PROC MIXED), considering the random effect of ejaculate of each bull and the fixed effects of treatment, bull and interaction. In experiment 1, spermatozoa from C-YOLK, YOLK + AST and C-YOLK DMSO groups showed the following results, respectively: progressive velocity (VSL)  $79.2^a \pm 1.3$ ,  $75.3^b \pm 1.3$  and  $75.4^b \pm 1.3$  ( $P = 0.02$ ); beat frequency (BCF)  $32.7^a \pm 0.4$ ,  $30.9^b \pm 0.4$  and  $31.3^b \pm 0.4$  ( $P < 0.01$ ); straightness (STR)  $88.9^a \pm 0.3$ ,  $87.3^b \pm 0.4$  and  $87.5^b \pm 0.4$  ( $P < 0.01$ ); minor defects  $2.4^b \pm 0.3$ ,  $3.2^a \pm 0.3$ , and  $2.2^b \pm 0.2$  ( $P = 0.01$ ); and mean mitochondrial membrane potential intensity  $9796.1^a \pm 495.5$ ,  $8028.3^b \pm 441.3$ , and  $8732.8^{ab} \pm 370.7$  ( $P = 0.04$ ). The other characteristics did not differ between groups ( $P > 0.05$ ). Unexpectedly in the traits where astaxanthin was superior or inferior to C-YOLK group, the results were similar to C-YOLK DMSO group, indicating that the observed effects cannot be attributed to astaxanthin. In experiment 2, there was no difference between the treatments. Since the addition of astaxanthin to commercial media generated negative results when using the egg yolk-based extender and null when using the liposome-based extender, there are indications that the composition of the extender possibly influences the sperm cell to require or not the supplementation with the antioxidant astaxanthin. The substances contained in the extenders may promote different effects on the sperm cell due to their composition or viscosity, and perhaps this is one reason that makes it difficult to repeat the results of studies involving antioxidants. Moreover, another hypothesis for our results is a possible antagonism between the antioxidants present in the commercial formulas, whose molecule type and amounts are not specified, or the dose of astaxanthin used in the present study. Thus, despite not having performed a comparison between the extenders, it can be inferred that possibly they act in different ways. We did not verify in our work the protective effect of astaxanthin against oxidative stress in the dose used, however, its adjustment may cause benefits. It is concluded that astaxanthin, at the concentration used, when added to commercial extenders based on egg yolk or liposomes does not reduce oxidative stress and therefore does not preserve sperm motility and mitochondrial potential, rejecting the initial hypothesis of this study.

**Keywords:** carotenoid, cryopreservation, oxidative stress, egg yolk, liposomes.

**Acknowledgements:** Laboratory of Molecular Morphophysiology and Development (LMMD/ZMV) for flow cytometer, as well as the companies Botupharma<sup>®</sup> and Reprodux<sup>®</sup> for providing the extenders.

## A concentração de proAKAP4 em sêmen de touros Nelore e sua relação às taxas de concepção na IATF

Ana Beatriz Marques de Almeida<sup>1</sup>, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Fábio Lucas Zito de Moraes<sup>2</sup>, Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>, Josiana de Fátima Schnitzer<sup>1</sup>, Leticia Amanda dos Santos Silva<sup>1</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>3</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>3</sup> e Maria Isabel Mello Martins<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> LARAA – Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil; <sup>2</sup> Veterinário Autônomo, Londrina, PR, Brazil; <sup>3</sup> Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - FMVZ – UNESP, Botucatu, SP – Brasil; <sup>4</sup> Departamento de Clínicas Veterinárias - UEL, Londrina, PR-Brasil

\*E-mail: imartins@uel.br

A proteína ancoradora da quinase A4 (AKAP4), localiza-se na bainha fibrosa do flagelo de espermatozoides mamíferos, e além de sua função estrutural também auxilia no mecanismo da motilidade espermática. Uma maneira de quantificar essa proteína é a partir de sua precursora, a proAKAP4, a qual já demonstrou relações com a cinética espermática e com as taxas de prenhez a campo, e por isso é considerada um biomarcador de qualidade e fertilidade seminal. Contudo, as concentrações de proAKAP4 em sêmen de touros de *Bos indicus* ainda não foram elucidadas. Assim, este estudo objetivou determinar as concentrações de proAKAP4 em doses de sêmen criopreservadas de touros Nelore e relacionar a expressão da precursora à cinética espermática e às taxas de concepção obtidas na IATF. Foram utilizadas uma amostra seminal de 9 touros Nelore. A análise cinética foi realizada no sistema CASA Hamilton-Thorne com set up ajustado para a espécie bovina; para quantificar as concentrações de proAKAP4 do sêmen foi utilizado o teste ELISA Bull 4MID kit®. A IATF foi conduzida em 1507 vacas Nelore, as quais foram inseminadas com doses das mesmas partidas analisadas neste estudo. A taxa de concepção foi resultado da relação entre fêmeas gestantes e fêmeas inseminadas. Para avaliar a influência e associação da proAKAP4 sobre a cinética espermática e às taxas de concepção foi empregada uma regressão linear com 5% de nível de significância. As taxas de concepção apresentaram valor médio de 52,52%. A concentração média de proAKAP4 foi de 25,75ng/10<sup>6</sup> de espermatozoides. A concentração de proAKAP4 influenciou positivamente a motilidade total (TM) e progressiva (PM) (TM:  $r^2 = 0,49$ ,  $P = 0,03$ ; PM:  $r^2 = 0,63$ ,  $P=0,01$ ), bem como a porcentagem de espermatozoides rápidos ( $r^2 = 0,50$ ,  $P = 0,03$ ). Além disso, a proAKAP4 demonstrou seu potencial preditivo sobre as taxas de concepção na IATF ( $r^2 = 0,51$ ,  $P=0,03$ ). A partir dos resultados, concluiu-se que as concentrações de proAKAP4 impactam na cinética espermática e nas taxas de concepção, desta forma, o polipeptídeo pode ser empregado como um biomarcador de qualidade e fertilidade do sêmen de touros Nelore.

**Palavras-chave** AKAP4, biomarcador, *Bos indicus*, fertilidade, touros.

## The proAKAP4 concentrations in Nellore bulls' sperm and its relation to FTAI conception rates results

Ana Beatriz Marques de Almeida<sup>1</sup>, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo<sup>1</sup>, Fábio Lucas Zito de Moraes<sup>2</sup>, Luiz Guilherme Corsi Trautwein<sup>1</sup>, Josiana de Fátima Schnitzer<sup>1</sup>, Leticia Amanda dos Santos Silva<sup>1</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>3</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>3</sup> and Maria Isabel Mello Martins<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> LARAA – Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil; <sup>2</sup> Self-employed veterinarian, Londrina, PR, Brazil; <sup>3</sup> Professor at the Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction - School of Veterinary Medicine and Animal Science of the Sao Paulo State University – UNESP, Botucatu, SP – Brazil; <sup>4</sup> Department of Animal Clinics of the Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, PR-Brazil  
\*E-mail: imartins@uel.br

The A-kinase anchoring protein 4 (AKAP4) is located in the flagellum fibrous sheath of the mammalian spermatozoa, in addition to its structural function, this protein also assists the sperm motility mechanism. This protein may be quantified from its precursor, the proAKAP4, which has already demonstrated relationships to the sperm kinetics and pregnancy rates in the field, therefore it is considered a biomarker of sperm quality and fertility. However, the concentrations of proAKAP4 of *Bos indicus* bulls' sperm have not yet been elucidated. This study aimed to determine the proAKAP4 concentrations in cryopreserved sperm doses from Nellore bulls and to relate precursor expression to sperm kinetics and conception rates obtained in FTAI. One seminal sample from 9 Nellore bulls was evaluated. The kinetic analysis was performed using the CASA Hamilton-Thorne system adjusted to bovine species; To quantify the sperm proAKAP4 concentrations, the Bull 4MID kit® ELISA test was performed. The FTAI was conducted in 1507 Nellore cows, which were inseminated with sperm doses from the same batches analyzed in this study. The conception rate was resulted from the relation between pregnant females and inseminated females. To assess the influence and association of proAKAP4 on sperm kinetics and conception rates, a linear regression was conducted, with a 5% significance level. Conception rates had an average value of 52.52%. The mean concentration of proAKAP4 was 25.75ng/106 spermatozoa. The concentration of proAKAP4 positively influenced the total (TM) and progressive (PM) motility (TM:  $r^2 = 0.49$ ,  $P = 0.03$ ; PM:  $r^2 = 0.63$ ,  $P=0.01$ ), as well as the percentage of fast sperm ( $r^2=0.50$ ,  $P=0.03$ ). Furthermore, proAKAP4 demonstrated its predictive potential on FTAI conception rates ( $r^2 = 0.51$ ,  $P=0.03$ ). From the results, it was concluded that proAKAP4 concentrations impact sperm kinetics and conception rates, thus, the polypeptide can be applied as a quality and fertility sperm biomarker for Nellore bulls.

**Keywords:** AKAP4, biomarker, *Bos indicus*, bulls, fertility.

## A suplementação de insulina ao diluidor de criopreservação espermática melhora a preservação da motilidade de touros de baixa congelabilidade

Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>; Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>; Fernando Andrade Souza<sup>3</sup>; Gabriela Marques de Rezende<sup>1</sup>; Leonardo Batissaco<sup>1</sup>; Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>; Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>4</sup>; Neimar Correa Severo<sup>4</sup>; João Pedro Brandão Zandonaide<sup>4</sup>; Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>2</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>3</sup> Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; <sup>4</sup> Alta Genetics, Uberaba, MG.

\*E-mail: celeghin@usp.br

O processo de criopreservação espermática induz injúrias físicas e químicas, causando danos nas membranas espermáticas e ocasionando diminuição na motilidade espermática e na capacidade de fecundação dos espermatozoides. Em adição, a capacidade do sêmen congelar e descongelar bem é característica de cada animal, assim os reprodutores podem ser classificados como indivíduos de alta e baixa congelabilidade, independente dos parâmetros espermáticos apresentados no sêmen *in natura*. Neste sentido, o uso de aditivos ao diluidor de criopreservação vem sendo estudado para melhor aproveitar ejaculados de touros considerados de baixa congelabilidade. Neste estudo foi proposta a adição de insulina e de IGF-I ao diluidor de criopreservação de sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade, com o objetivo de avaliar o efeito protetor sobre a motilidade espermática. Foram utilizados quatro ejaculados de 10 touros de alta (n=40) e de 10 touros de baixa (n=40) congelabilidade da raça Nelore. Cada ejaculado foi dividido em três frações iguais, sendo acrescentados os tratamentos: Controle: somente diluidor (Triladyl<sup>®</sup>); IGF-I: diluidor + IGF-I (100 ng/mL) e INS: diluidor + insulina (150 µUI/mL). Após a criopreservação, o sêmen foi avaliado quanto às características de motilidade pelo sistema CASA (SCA<sup>®</sup> - Sperm Class Analyser; Microptic, Barcelona, Espanha). As características investigadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, m/s), oscilação do trajeto real (WOB, %), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Foram considerados os efeitos de tratamento (controle, IGF-I e insulina) e grupo (alta e baixa congelabilidade). Os dados foram submetidos à Análise de variância, seguido de Teste de Tukey, com nível de significância de 5%. O grupo de alta congelabilidade apresentou maior (P=0,0022) percentual de MT (81,26%) que os animais de baixa congelabilidade (66,05%). No grupo de baixa congelabilidade, a insulina proporcionou maior (P<0,0001) preservação da MT (63,74%) quando comparado ao controle (54,47%), não diferindo do IGF-I (60,78%). Não houve efeito dos tratamentos instituídos dentro do grupo de alta congelabilidade para MT (P>0,05). Para MP os animais de alta congelabilidade apresentaram maior (P<0,001) percentual (70,38%) quando comparado ao de baixa congelabilidade (53,14%). A adição de insulina foi eficiente (P<0,05) na preservação da MP (49,64%) para touros de baixa congelabilidade quando comparado ao controle (39,35%) e ao IGF-I (41,04%). O VAP foi maior (P ≤ 0,001) para animais de alta congelabilidade (60,63 m/s) quando comparado com animais de baixa congelabilidade (53,79 m/s). Dentro do grupo de baixa congelabilidade, observou-se que a adição de insulina contribuiu para a melhor criopreservação (P ≤ 0,05) de VAP (66,69 µm/s) do que os demais tratamentos, controle (58,44 µm/s) e IGF-I (64,36 m/s). Não houve efeito (P>0,05) da suplementação da insulina e do IGF-I para as outras características (VSL, STR, LIN, WOB e BCF). Pode-se concluir que a insulina na concentração de 150 µUI/mL adicionada ao diluidor de criopreservação de sêmen é capaz de preservar melhor a motilidade espermática e pode ser uma alternativa promissora para touros de baixa congelabilidade.

**Palavras-chave:** Bovinos, criopreservação, sêmen, IGF-I .

## Insulin supplementation to the extender improves the preservation of sperm motility in low-freezability bulls

Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>; Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>; Fernando Andrade Souza<sup>3</sup>; Gabriela Marques de Rezende<sup>1</sup>; Leonardo Batissaco<sup>1</sup>; Mariana Andrade Torres<sup>1</sup>; Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>; Manoel Francisco Sá Filho<sup>4</sup>; Neimar Correa Severo<sup>4</sup>; João Pedro Brandão Zandonaide<sup>4</sup>; Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology - Center of Biotechnology in Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>2</sup> Laboratory of Semen Biotechnology and Andrology - Center of Biotechnology in Animal Reproduction - Department of Animal Reproduction - FMVZ-USP, Pirassununga, SP; <sup>3</sup> Federal University of Paraná, Curitiba, PR; <sup>4</sup> Alta Genetics, Uberaba, MG.

\*E-mail: celeghin@usp.br

The process of sperm cryopreservation induces physical and chemical injuries, causing damage to sperm membranes and entailing a decrease in sperm motility and fertilizing capacity. In addition, the ability of semen to freeze and thaw well is characteristic of each animal, so that the bulls can be classified as individuals with high and low freezability, regardless of the sperm parameters presented in *in natura* semen. In this sense, the use of additives to the cryopreservation extender has been studied to better take advantage of ejaculates from bulls considered to have low freezability. In this study it was proposed the addition of insulin and IGF-I to the extender for semen cryopreservation of bulls with high and low freezability, with the objective to evaluate the protective effect on sperm motility. Four ejaculates from 10 bulls of high (n=40) and 10 bulls of low (n=40) freezability of the Nellore breed were used. Each ejaculate was divided into three equal fractions, and the treatments were added: Control: only extender (Trilady<sup>®</sup>); IGF-I: extender + IGF-I (100 ng/mL) and INS: extender + insulin (150  $\mu$ UI/mL). After cryopreservation, the semen was evaluated for motility characteristics by the CASA system (SCA<sup>®</sup> - Sperm Class Analyser; Microptic, Barcelona, Spain). The characteristics investigated were total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP,  $\mu$ m/s), straight-line velocity (VSL,  $\mu$ m/s), curvilinear velocity (VCL, m/s), wobble (WOB, %), amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu$ m), beat-cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %) and linearity (LIN, %). The effects of treatment (control, IGF-I and insulin) and group (high and low freezability) were considered. Data were submitted to analysis of variance, followed by Tukey's test, with a significance level of 5%. The high-freezability group had a higher (P=0.0022) percentage of TM (81.26%) than the low-freezability animals (66.05%). In the low-freezability group, insulin provided greater (P<0.0001) preservation of TM (63.74%) when compared to the control (54.47%), not differing from IGF-I (60.78%). There was no effect of treatments instituted within the high-freezability group for TM (P>0.05). For PM, the animals with high freezability presented a higher (P $\leq$ 0.001) percentage (70.38%) when compared to the animals with low freezability (53.14%). The addition of insulin was efficient (P $\leq$ 0.05) in preserving PM (49.64%) for low-freezability bulls when compared to control (39.35%) and IGF-I (41.04%). The VAP was higher (P  $\leq$  0.001) for animals with high freezability (60.63 m/s) when compared to animals with low freezability (53.79 m/s). In the low- freezability group, it was observed that the addition of insulin contributed to a better cryopreservation (P  $\leq$ 0.05) of VAP (66.69  $\mu$ m/s) than the other treatments, control (58.44  $\mu$ m/s) and IGF-I (64.36 m/s). There was no effect (P>0.05) of insulin and IGF-I supplementation for the other characteristics (VSL, STR, LIN, WOB and BCF). It can be concluded that insulin at a concentration of 150  $\mu$ UI/mL added to the semen cryopreservation extender is able to better preserve sperm motility and may be a promising alternative for low- freezability bulls.

**Keywords:** Bovine, cryopreservation, sperm, IGF-I

## Adição de antioxidantes em meio diluidor de congelamento e seus efeitos na cinética espermática em bovino

Danielle Andressa Oliveira Sestari<sup>1</sup>, Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>3</sup>, André Maciel Crespillo<sup>4</sup>, Bruno Argenton de Barros<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>2</sup>, Ana Caroline Chaves Vall Nicolás<sup>2</sup>, Rosiara Rosaria Dias Maziero Guaitolini<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com ênfase em produtos bioativos – UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil; <sup>2</sup>CRV Brazil, Ribeirão Preto, SP, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Mestrado em bem-estar animal – UNISA, São Paulo, SP, Brasil.

\*E-mail: rosiaramaziero@gmail.com

Durante o processo de criopreservação, o ejaculado é exposto ao metabolismo aeróbico, levando ao estresse oxidativo das células espermáticas, pela ação de espécies reativas de oxigênio. Devido ao desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação pelo sistema antioxidante intra e extracelular, ocorrem alterações estruturais e funcionais nos espermatozoides, que podem influenciar o processo de fertilização. Os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, pela inibição da produção ou dos efeitos deletérios dos radicais livres. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética do sêmen bovino congelado em meio diluidor comercial Botubov<sup>®</sup>, com a adição dos antioxidantes piruvato de sódio, melatonina e  $\alpha$ -tocoferol. Os animais foram selecionados previamente, quanto ao escore de condição corporal, exame clínico geral, exame clínico específico do sistema genital, avaliação das características físicas do ejaculado (volume, cor e odor) e de cinética espermática (motilidade total  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 4$ ), morfologia espermática (defeitos totais  $\leq 30\%$ , defeitos maiores  $\leq 10\%$  e defeitos menores  $\leq 20\%$ ). Foram realizadas três coletas de sêmen, com intervalos semanais, pelo método de eletroejaculação, de três touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre 24 a 30 meses. Para evitar o estresse dos animais, o local do estudo apresentava estrutura de currais e troncos anti-estresse, priorizando o bem-estar. As amostras obtidas foram divididas em quatro tratamentos: T1, grupo controle (sem adição de antioxidante); T2 e T3, adicionados de piruvato de sódio (1,0 e 1,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente); T4 e T5, adicionados de melatonina (50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente); T6 e T7, adicionados de  $\alpha$ -tocoferol (20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente). A concentração final por palheta após a diluição foi de  $120 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Para avaliação dos dados foi realizada uma regressão múltipla linear com intuito de avaliar a influência do touro, momento da coleta e grupo experimental para os parâmetros de cinética espermática. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados, análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. A análise estatística foi realizada no software Sigma-plot 12.0. Após o processo de criopreservação, as amostras foram descongeladas à 37°C durante 30 segundos, para avaliação da cinética espermática no sistema computadorizado (CASA – IVOS Hamilton Thorne), em que foi observada diferença entre os touros e partidas ( $P < 0,05$ ). Assim, verificou-se diferença entre os parâmetros de motilidade total ( $p = 0,012$ ), motilidade progressiva ( $p = 0,016$ ) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido ( $p = 0,006$ ) entre os touros e diferença entre as partidas, nos parâmetros de porcentagem de espermatozoides com movimento médio ( $p = 0,033$ ), velocidade de trajeto ( $p = 0,005$ ), velocidade curvilínea ( $p = 0,002$ ), deslocamento lateral da cabeça ( $p = 0,005$ ). No entanto, não foi observada diferença nos parâmetros de cinética espermática ( $P > 0,05$ ) entre o grupo controle e os grupos experimentais, os quais receberam os antioxidantes piruvato de sódio, melatonina e  $\alpha$ -tocoferol. Conclui-se que a adição dos antioxidantes piruvato de sódio, melatonina e  $\alpha$ -tocoferol nas concentrações testadas não interferiram na cinética espermática do sêmen bovino pós-criopreservação quando adicionadas ao diluidor comercial Botubov<sup>®</sup>.

**Palavras-chave** Antioxidantes, bovino, cinética espermática, criopreservação.

## Addition of antioxidants in freezing medium and their effects on bovine sperm kinetics

Danielle Andressa Oliveira Sestari<sup>1</sup>, Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>3</sup>, André Maciel Crespilha<sup>4</sup>, Bruno Argenton de Barros<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>2</sup>, Ana Caroline Chaves Vall Nicolás<sup>2</sup>, Rosiara Rosaria Dias Maziero Guaitolini<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com ênfase em produtos bioativos – UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil; <sup>2</sup>CRV Brazil, Ribeirão Preto, SP, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Mestrado em bem-estar animal – UNISA, São Paulo, SP, Brasil.

\*E-mail: rosiaramaziero@gmail.com

During the cryopreservation process, the ejaculate is exposed to aerobic metabolism, leading to oxidative stress in sperm cells, by the action of reactive oxygen species. Due to the imbalance between the production of reactive oxygen species and their elimination by the intra and extracellular antioxidant system, structural and functional changes occur in spermatozoa, which can influence the fertilization process. Antioxidants are substances that slow down the rate of oxidation by inhibiting the production or the deleterious effects of free radicals. Thus, the objective of the present study was to evaluate the kinetics of bovine semen frozen in commercial dilution medium Botubov®, with the addition of the antioxidants sodium pyruvate, melatonin and  $\alpha$ -tocopherol. The animals were previously selected in terms of body condition score, general clinical examination, specific clinical examination of the genital system, evaluation of the physical characteristics of the ejaculate (volume, color and odor) and sperm kinetics (total motility  $\geq 70\%$  and vigor 4), sperm morphology (total defects  $\leq 30\%$ , major defects  $\leq 10\%$  and minor defects  $\leq 20$ ). Three weekly semen collections were accomplished, by the electroejaculation method, from three Nelore (*Bos taurus indicus*) bulls, aged between 24 and 30 months. To avoid stress to the animals, the study site had a structure of corrals and anti-stress cattle chutes, prioritizing well-being. The samples obtained were divided into 4 experimental groups: T1, control group (without addition of antioxidant); T2 and T3, addition of sodium pyruvate (1.0 and 1.5  $\mu\text{M}$ , respectively); T4 and T5, addition of melatonin (50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ , respectively); T6 and T7, addition of  $\alpha$ -tocopherol (20  $\mu\text{M}$  and 40  $\mu\text{M}$ , respectively). The final concentration per straw after dilution was  $120 \times 10^6$  sperm/mL. To evaluate the data, a multiple linear regression was accomplished in order to evaluate the influence of the bull, the moment of semen collection and the experimental group for the sperm kinetics parameters. The Shapiro-Wilk test was used to evaluate data normality, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. Statistical analysis was performed using the software "Sigma-plot 12.0". After the cryopreservation process, the samples were thawed at 37°C for 30 seconds, for evaluation of sperm kinetics in the computerized system (CASA – IVOS Hamilton Thorne), in which a difference was observed between bulls and batches ( $P < 0.05$ ). Thus, there was a difference between the parameters of total motility ( $p = 0.012$ ), progressive motility ( $p = 0.016$ ) and percentage of fast-moving sperm ( $p = 0.006$ ) among bulls and different batches, in the parameters of percentage of sperm with average movement ( $p = 0.033$ ), time-average velocity ( $p = 0.005$ ), curvilinear velocity ( $p = 0.002$ ), lateral displacement of the head ( $p = 0.005$ ). However, no difference was observed in sperm kinetic parameters ( $P > 0.05$ ) between the control group and the experimental groups that received the antioxidants sodium pyruvate, melatonin and  $\alpha$ -tocopherol. It is concluded that the addition of the antioxidants sodium pyruvate, melatonin and  $\alpha$ -tocopherol at the concentrations tested did not interfere with the sperm kinetics of post-cryopreservation bovine semen, when added to the commercial dilution medium Botubov®.

**Keywords:** Antioxidants, bovine, cryopreservation, sperm kinetics.



## Crescimento testicular de bovinos jovens Nelore e Canchim criados a pasto: um estudo de caso

Giovanna Galhardo Ramos<sup>1,3\*</sup>, Andréa do Nascimento Barreto<sup>2</sup>, Mariana Jucá Moraes<sup>2</sup>, Livia Ferreira Pinho<sup>2</sup>, Letícia Krünger Zanetti<sup>3</sup>, Gabriela Novais Azevedo<sup>3</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Treinamento Técnico FAPESP; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UFPA, Belém, PA, Brasil; <sup>3</sup>Centro Universitário Central Paulista-UNICEP, São Carlos, SP, Brasil; <sup>4</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil  
\*E-mail: giiovannagalhardo@gmail.com

O perímetro escrotal (PE) é uma medida biométrica facilmente mensurável em bovinos. É utilizada como um dos parâmetros básicos na seleção de touros jovens participantes de programas de melhoramento. Selecionar animais com base no PE possibilita incrementar indiretamente outras características de interesse, como o volume testicular e a produção espermática. O desenvolvimento testicular é influenciado pela condição de saúde do animal, por fatores do meio e por fatores genéticos. Nesse sentido, espera-se que animais de raças distintas apresentem diferenças de crescimento do PE, principalmente considerando animais de origem zebuína, taurina, ou de raças compostas, como o Canchim. Por isso, o experimento teve por objetivo avaliar o crescimento testicular de bovinos até 24 meses de idade das raças Nelore e Canchim, nascidos a partir de 2008, e determinar as equações preditivas para as respectivas raças, em um rebanho experimental criado a pasto. O trabalho foi realizado na Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos-SP (22°01'S, 47°53'W 860m). Foram utilizadas informações do banco dados da instituição, derivadas de acompanhamentos zootécnicos realizados por pesquisadores, de animais nascidos entre 2008 e 2021. O histórico de biometrias usado abrangeu 1507 machos bovinos, puros de origem, com genealogia, histórico sanitário e zootécnico conhecidos. Desses animais, 290 eram raça Nelore (*Bos indicus*) e 1217 animais eram raça Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*). O levantamento de dados considerou animais de 4 a 24 meses de idade, criados a pasto. A mensuração do perímetro escrotal foi realizada com fita maleável graduada (mm), posicionada na região de maior perímetro do escroto, conforme recomendado pelo CBRA (2013). A equação de regressão calculada para o crescimento do PE dos animais Nelore foi  $Y' = 11,65 + 0,81X$ , com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0.6811, enquanto para os animais Canchim foi  $Y' = 11,15 + 0,91X$ , com coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0.6945, sendo X a idade do animal (meses) e Y o perímetro escrotal estimado (cm). Segundo as equações obtidas, a estimativa de PE aos 24 meses para animais da raça Nelore foi de 31,1 cm com 394,8 kg de peso vivo, enquanto para animais da raça Canchim foi de 33,0 cm com 351,3 kg de peso vivo, à mesma idade. Há três décadas, foram reportados como limites inferior e superior de PE aos 24 meses para animais Nelore de 24,4 a 33,4 cm (Silva et. al., 1993). Já para animais Canchim, dados dos anos 80 apontam que o PE era de  $29,8 \pm 1,9$  cm, para o mesmo rebanho estudado (Alencar e Vieira, 1989), demonstrando uma evolução dessa característica fenotípica. Segundo Associação Brasileira de Criadores de Canchim, o valor sugerido atualmente para PE de touros é 31,0 cm aos 24 meses (ABCCAN, 2018 apud Garcia, 2018). Nota-se que as equações que descrevem as estimativas das curvas de crescimento apresentaram peculiaridades, que são dependentes das raças analisadas. Isso indica que, ainda que sejam criados em um mesmo sistema de produção, a evolução no PE de machos bovinos jovens é dependente da composição genotípica do grupo avaliado. Esse efeito pode ser atribuído à variação na conformação anatômica dos testículos, que é distinta entre raças. Ainda, pode-se atribuir parte desse efeito à diferente pressão de seleção exercida para a característica de perímetro escrotal nas últimas décadas, a depender da raça analisada. Conclui-se que, comparativamente aos registros históricos das décadas de 80 e 90, houve evolução do perímetro escrotal em ambas as raças, porém com magnitudes distintas, sendo maior na raça Canchim devido à maior pressão de seleção dentro do rebanho estudado. Ainda, nota-se que a análise da expectativa de crescimento testicular dentro de um mesmo rebanho deve considerar a eventual diferença de genótipo dos animais, pois o uso de um modelo de predição único pode induzir a equívocos de interpretação e penalizar animais não necessariamente inferiores.

**Palavras-chave:** andrologia animal, perímetro escrotal, touros jovens, bovinos de corte; genótipo.

**Agradecimentos:** CAPES, CNPq, Fapesp (Processo 2019/04528-6).

## Testicular growth of Nelore and Canchim young bulls raised on pasture: a case report

Giovanna Galhardo Ramos<sup>1,3\*</sup>, Andréa do Nascimento Barreto<sup>2</sup>, Mariana Jucá Moraes<sup>2</sup>, Livia Ferreira Pinho<sup>2</sup>,  
Letícia Krüger Zanetti<sup>3</sup>, Gabriela Novais Azevedo<sup>3</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Treinamento Técnico FAPESP; <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UFPA, Belém, PA, Brasil; <sup>3</sup>Centro Universitário Central Paulista-UNICEP, São Carlos, SP, Brasil; <sup>4</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil

\*E-mail: giiovannagalhardo@gmail.com

The scrotal circumference (SC) is a biometric measurement easily measurable in cattle. It is used as one of the basic parameters for selecting young bulls in breeding programs. Selecting animals based on SC can indirectly increase other characteristics of interest, such as testicular volume and sperm production. The testicular development is influenced by the animal health condition, the environment and genetic factors. In this sense, it is expected that animals of different breeds show differences in growth of the SC, especially considering animals of zebu, taurine, or compound breeds, such as Canchim. Therefore, the experiment aimed to evaluate the testicular growth of Nelore and Canchim bulls up to 24 months of age, born from 2008, and to determine the predictive equations for the SC of respective breeds, in an experimental herd raised on pasture. The study was carried out at Embrapa Pecuária Sudeste, in São Carlos-SP (22°01'S, 47°53'W 860m). Information from the institution's database was used, considering zootechnical monitoring conducted by researchers, related to males born between 2008 and 2021. The database considered the biometric records of 1507 purebred males with known genealogy, health and management historic. Of these animals, 290 were Nelore (*Bos indicus*) and 1217 animals were Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*). The data collection covered animals from 4 to 24 months of age, raised on pasture. The measurement of SC was performed with graduated flexible tape (mm) that was positioned in the region of greatest scrotal circumference, as recommended by CBRA (2013). The regression equation calculated for the growth of the SC of Nelore animals was  $Y' = 11.65 + 0.81X$ , with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.6811, while for Canchim animals it was  $Y' = 11.15 + 0.91X$ , with a coefficient of determination ( $R^2$ ) of 0.6945, where X is the age of the animal (months) and Y is the estimated scrotal circumference (cm). According to the equations obtained, the estimated SC at 24 months for Nelore was 31.1 cm with 394.8 kg live weight, while for Canchim was 33.0 cm with 351.3 kg live weight, at the same age. Three decades ago, the lower and upper limits for scrotal circumference at 24 months were reported for Nelore animals, from 24.4 to 33.4 cm (Silva et. al., 1993). Considering Canchim animals, data from the 80's indicate that the scrotal circumference was  $29.8 \pm 1.9$  cm, within the same herd studied (Alencar and Vieira, 1989), demonstrating an evolution of this phenotypic characteristic. According to Brazilian Association of Canchim Breeders, the current suggested value for scrotal circumference is 31.0 cm at 24 months (ABCCAN, 2018 apud GARCIA, 2018). It is noted that the equations describing the estimates of the growth curves presented peculiarities, which are dependent on the breeds analyzed. This indicates that, even if they are raised in the same production system, the evolution in the SC of young bulls is dependent on the genotypic composition of the evaluated group. This effect can be attributed to the variation in the anatomical conformation of the testes, which is distinct among breeds. Also, part of this effect can be attributed to the different selection pressure exerted on the trait of scrotal circumference in recent decades, depending on the breed analyzed. In conclusion, compared to the historical records from the 80's and 90's, there was an evolution of scrotal circumference in both breeds, but with different magnitudes, being higher in the Canchim breed due to greater selection pressure exerted within the herd studied. Also, it is noted that the analysis of expected testicular growth within the same herd should consider the possible difference in genotype of animals, because the use of a single prediction model can lead to misinterpretation and penalize animals not necessarily inferior.

**Keywords:** animal andrology, scrotal circumference, young bulls, beef cattle; genotype.

**Acknowledgements:** CAPES, CNPq, Fapesp (Process 2019/04528-6).

## Degeneração testicular: alterações espermáticas e sua relação com a hemodinâmica testicular em touros da raça Nelore

Vitor Hugo Guilger Gonzaga<sup>1</sup>, Flávia Santos Almeida<sup>1</sup>, Maira Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Vinícius José Moreira Nogueira<sup>1</sup>, Shirley Andrea Florez-Rodriguez<sup>1</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Débora Fernandes Barreira<sup>1</sup>, Kelcy Carolina Oliveira<sup>1</sup>, Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Creonte Cândido da Silva<sup>1</sup>, Lais Maria Gomes<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brasil

\*E-mail: celeghin@usp.br

O estresse térmico em touros é um fator muito importante, pois afeta negativamente o comportamento e a eficiência reprodutiva dos animais. Uma das causas deste efeito adverso é a ineficiência da termorregulação testicular, que conduz ao aumento do metabolismo celular, causando estresse oxidativo e apoptose das células germinativas, o que caracteriza a degeneração testicular (DEG) e que pode levar à infertilidade, ou mesmo à esterilidade. O diagnóstico para tal afecção é de suma importância, desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar a eficiência da ultrassonografia em modos Doppler e espectral como instrumento auxiliar para o diagnóstico da DEG em bovinos. Utilizou-se 16 touros da raça Nelore separados em dois grupos experimentais: CON: animais sem indução à degeneração testicular (n = 08) e INS: animais induzidos à degeneração testicular (n = 08) por meio da colocação de bolsas insuladoras nos testículos, mantidas por 96 horas. Os animais foram submetidos semanalmente a avaliações das características clínicas e seminais, realizando-se as análises duas semanas antes da insulação testicular (S-2 e S-1), no dia da retirada da bolsa (D0) e durante quatro semanas após a retirada da mesma (S+1 a S+4). Foram avaliadas frequência cardíaca (FC, bpm), frequência respiratória (FR, mrpm) e temperatura retal (TR). Os testículos foram primeiramente avaliados quanto ao perímetro escrotal (PE, cm) e à consistência testicular (CT, escore de 1 a 5), em seguida foram avaliados quanto à vascularização do parênquima testicular, sendo classificados em escores (EVT, 0-4), utilizando-se a ultrassonografia em modo color Doppler. O plexo pampiniforme foi avaliado quanto ao escore de vascularização (EVP, 1-5) e índice de resistência vascular (IRV, 0-1), por ultrassonografia em modos color Doppler e espectral, respectivamente. O sêmen dos touros foi colhido e avaliado considerando motilidade (MT), vigor (VG), morfologia (defeitos maiores, menores e totais), integridade das membranas plasmática (PI), acrossomal (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (AP) e a associação destas características (PIAIA). Para a análise estatística foi utilizado o *Statistical Analysis Software* (SAS 9.3). Os dados das avaliações realizadas em S-2 e S-1 foram submetidos ao procedimento MIXED considerando dois grupos (CON e INS). Os dados das avaliações realizadas após a insulação foram submetidos ao procedimento MIXED e adicionando o fator tempo por meio do comando REPEATED. O nível de significância considerado foi de  $P \leq 0,05$ ; sendo considerada tendência quando este ficou entre 0,051 e 0,1. Os grupos de touros foram semelhantes nas semanas pré-insulação. Nas semanas pós-insulação, notou-se interação entre tempo e tratamento para FR ( $p=0,04$ ), CT ( $p=0,0003$ ) e IRV ( $p=0,03$ ) e tendência para EVT ( $p=0,08$ ). Foram observados maiores valores de EVT para o INS ( $3,25 \pm 0,11$ ) do que para o CON ( $2,65 \pm 0,10$ ), mas menores valores de PE ( $34,43 \pm 0,35$  vs  $36,26 \pm 0,47$ cm), CT ( $2,51 \pm 0,09$  vs  $3,11 \pm 0,06$ ), EVP ( $3,71 \pm 0,11$  vs  $4,00 \pm 0,09$ ) e IRV ( $0,56 \pm 0,01$  vs  $0,59 \pm 0,01$ ) para INS do que para CON. Além disso, encontrou-se interação entre tempo e tratamento para MT ( $p=0,01$ ), defeitos morfológicos ( $p < 0,001$ ) e AP ( $p=0,01$ ) e tendência para PIAIA ( $p=0,07$ ). O grupo INS apresentou queda na MT ( $61,38 \pm 2,49\%$ ;  $p=0,001$ ), HMP ( $64,76 \pm 3,96\%$ ;  $p=0,005$ ) e PIAIA ( $58,30 \pm 3,94\%$ ;  $p=0,01$ ) quando comparado com o grupo CON ( $70,83 \pm 1,26\%$ ;  $77,79 \pm 3,00\%$ ;  $71,98 \pm 2,36\%$ , respectivamente) associado com aumento nos defeitos morfológicos maiores ( $32,59 \pm 4,36\%$  vs  $12,37 \pm 3,67\%$ ;  $p < 0,0001$ ), menores ( $8,02 \pm 1,50\%$  vs  $1,55 \pm 0,22\%$ ;  $p < 0,0001$ ) e totais ( $40,61 \pm 4,41\%$  vs  $13,93 \pm 3,72\%$ ;  $p < 0,0001$ ). Conclui-se que o estresse térmico testicular provoca um quadro de degeneração testicular, caracterizado por redução na CT, MT, PI, AP e PIAIA; e aumento nos defeitos morfológicos espermáticos. Este quadro foi acompanhado pelo aumento da vascularização do parênquima testicular e redução da vascularização dos vasos do plexo pampiniforme. Desta forma, a ultrassonografia testicular em modo Doppler pode contribuir para o diagnóstico da degeneração testicular em touros.

**Palavras-chave:** Ultrassonografia, diagnóstico, escore de vascularização, parênquima testicular, plexo pampiniforme.

## Testicular degeneration: sperm alterations and their relationship with testicular hemodynamic in Nellore bulls

Vitor Hugo Guilger Gonzaga<sup>1</sup>, Flávia Santos Almeida<sup>1</sup>, Maíra Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Vinícius José Moreira Nogueira<sup>1</sup>, Shirley Andrea Florez-Rodriguez<sup>1</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Débora Fernandes Barreira<sup>1</sup>, Kelcy Carolina Oliveira<sup>1</sup>, Sâmara Cristine Costa Pinto<sup>1</sup>, Creonte Cândido da Silva<sup>1</sup>, Lais Maria Gomes<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução - Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal - Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP, Pirassununga, SP, Brasil

\*E-mail: celeghin@usp.br

Heat stress in bulls is a very important factor because it adversely affects the reproductive behavior and reduces the reproductive efficiency. One of the causes of this adverse effect is the inefficiency of testicular thermoregulation, which leads to increased cellular metabolism, causing oxidative stress and apoptosis of germ cells, which characterizes testicular degeneration (TD), which can lead to infertility or even to animal sterility. The diagnosis of this condition is of paramount importance, therefore, this study aimed to evaluate the efficiency of ultrasound in Doppler and spectral modes as an auxiliary tool for the diagnosis of TD in bulls. Sixteen Nellore bulls were divided in two experimental groups: **CON**: animals without induction to testicular degeneration (n = 08); and **INS**: animals induced to testicular degeneration (n = 08) through insulation bags, maintained for 96 hours. Animals underwent weekly evaluations of clinical and seminal characteristics, performed assessments two weeks prior to testicular insulation (S-2 and S-1), on the day of the removal of the bag (D0) and during four week after removal of the bag (S+1 to S+4). Heart rate (HR, bpm), respiratory rate (RR, bmpm) and rectal temperature (RT) were evaluated. The testes were evaluated for scrotal circumference (SC, cm) and testicular consistency (TC, score from 1 to 5), then they were evaluated for vascularization of the testicular parenchyma, being classified into scores (VTP, 0-4), using color Doppler ultrasonography. The pampiniform plexus was evaluated for vascularization score (VPP, 1-5) and vascular resistance index (IR, 0-1) by ultrasonography in color Doppler and spectral modes, respectively. The semen of the bulls was collected and evaluated considering motility (MT), vigor (VG), morphology (major, minor and total defects), plasma membrane integrity (PI), acrosomal membrane integrity (AI), high mitochondrial membrane potential (HMP) and the association of these characteristics (PIAIA). Statistical analysis was performed using Statistical Analysis Software (SAS 9.3). Data from the S-2 and S-1 evaluations were submitted to the MIXED procedure considering two groups (CON and INS). Data from the evaluations performed after the insulation were submitted to the MIXED procedure adding the time factor through the REPEATED command. The significance level considered was  $P \leq 0.05$ , being considered a trend when it was between 0.051 and 0.1. The groups were similar in the pre-insulation period. In the post-insulation weeks, it was noted the interaction between time and treatment for RR ( $p = 0.04$ ), TC ( $p = 0.0003$ ) and RI ( $p = 0.03$ ) and a tendency to VTP ( $p = 0.08$ ). Greater values were observed for VTP for INS ( $3.25 \pm 0.11$ ) than for CON ( $2.65 \pm 0.10$ ), but lower values of SC ( $34.43 \pm 0.35$  vs  $36.26 \pm 0.47$  cm), TC ( $2.51 \pm 0.09$  vs  $3.11 \pm 0.06$ ), VPP ( $3.71 \pm 0.11$  vs  $4.00 \pm 0.09$ ) and RI ( $0.56 \pm 0.01$  vs  $0.59 \pm 0.01$ ) for INS than for CON. In addition, there was interaction between time and treatment for MT ( $p = 0.01$ ), morphological defects ( $p < 0.001$ ) and HMP ( $p = 0.01$ ) and tendency for PIAIA ( $p = 0.07$ ). The INS group presented decrease in MT ( $61.38 \pm 2.49\%$ ;  $p = 0.001$ ), HMP ( $64.76 \pm 3.96\%$ ;  $p = 0.005$ ) and PIAIA ( $58.30 \pm 3.94\%$ ;  $p = 0.01$ ) when compared to the CON group ( $70.83 \pm 1.26\%$ ;  $77.79 \pm 3.0\%$ ;  $71.98 \pm 2.36\%$ , respectively) associated with increase in morphological major defects ( $32.59 \pm 4.36\%$  vs  $12.37 \pm 3.67$ ;  $p < 0.0001$ ), minor ( $8.02 \pm 1.50\%$  vs  $1.55 \pm 0.22$ ;  $p < 0.0001$ ) and total ( $40.61 \pm 4.41\%$  vs  $13.93 \pm 3.72$ ;  $p < 0.0001$ ). In conclusion, testicular heat stress causes a testicular degeneration, characterized by reduction in TC, MT, PI, HMP and PIAIA; and increase in sperm morphological defects. This condition was accompanied by an increases in the vascularization of the testicular parenchyma and reduction in the vascularization of the pampiniform plexus. Thus, testicular ultrasound in Doppler mode may contribute to the diagnosis of testicular degeneration in bulls.

**Keywords:** Ultrasonography, diagnosis, vascularization score, testicular parenchyma, pampiniform plexus.

## Efeito da motilidade e cinética espermática na fertilidade de touros da raça Nelore submetidos a estação de monta natural

Marina de Oliveira Silva<sup>1\*</sup>, Marcelo Sant'Ana Borges<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>1</sup>, Naiara Nantes Rodrigues<sup>1</sup>,  
Jaine Martelo Pagoto<sup>1</sup>, Leticia Padovani da Silva<sup>2</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>2</sup>, Fabio Morato  
Monteiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, FCAV, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil;

<sup>2</sup>Instituto de Zootecnia (IZ), Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, Sertãozinho, SP, Brasil.

\*E-mail: marinaoliveira.silva21@gmail.com

A automação da análise de cinética espermática proporciona detalhes sobre cada ejaculado permitindo a identificação de subpopulações espermáticas com base em suas características de movimento. Entretanto, ainda não se sabe com clareza quais parâmetros fornecidos pela análise computadorizada do movimento espermático (CASA- *Computer Assisted Sperm Analysis*) contribuem para melhor inferência do potencial reprodutivo do sêmen fresco e congelado. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi analisar e comparar a motilidade e cinética espermática do sêmen fresco de touros Nelore com diferentes taxas de prenhez obtidas de estação de monta natural (EMN). Foram utilizados 29 touros com idade entre 2 e 4 anos, e peso corporal de  $546 \pm 79$  kg em 2 anos de experimento, sendo 14 touros no primeiro ano e 15 no segundo ano. As colheitas do sêmen foram realizadas através de eletroejaculação, e o material coletado foi analisado pelo CASA. Os touros participaram da estação de monta natural com duração de três meses com proporção macho:fêmeas média de 1:22 (01 touro para 22 vacas em lotes individuais). A classificação de fertilidade dos touros foi obtida através do resultado final da taxa de prenhez da EMN (90 dias de duração). Os touros foram classificados em baixa taxa de prenhez (BP; N=9 com 66,57%); média taxa de prenhez (MP; N=10 com 76,47%) e alta taxa de prenhez (AP; N=10 com 84,80%). Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando modelos mistos com o auxílio do programa SAS (SAS® 9.4 version), a significância foi declarada quando  $P < 0,05$ . Não houve diferença significativa entre os touros de alta, média e baixa taxa de prenhez nas variáveis motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retidão (STR, %) e linearidade (LIN, %). Touros de MP e AP apresentaram espermatozoides com maior média de velocidade de trajeto (VAP;  $P=0,01$ ) ( $114,96 \pm 3,34 \mu\text{m/s}$  e  $110,98 \pm 3,34 \mu\text{m/s}$ , respectivamente) e velocidade em linha reta (VSL;  $P=0,03$ ) ( $86,92 \pm 1,97 \mu\text{m/s}$  e  $87,05 \pm 1,97 \mu\text{m/s}$ , respectivamente) do que espermatozoides de touros de BP (VAP= $100,02 \pm 3,34 \mu\text{m/s}$  e VSL= $79,84 \pm 1,97 \mu\text{m/s}$ ). O valor médio de velocidade curvilínea (VCL) foi similar em touros de BP e AP ( $173,22 \pm 8,19 \mu\text{m/s}$  e  $190,78 \pm 8,19 \mu\text{m/s}$ , respectivamente), entretanto touros com MP ( $201,40 \pm 8,19 \mu\text{m/s}$ ) foram superiores aos touros de BP ( $P=0,02$ ) e similares aos touros de AP ( $P=0,34$ ). Com isso, foi concluído que as variáveis VAP, VSL e VCL fornecidas pelo CASA podem auxiliar na escolha e seleção de touros para o manejo de EMN, uma vez que esses parâmetros se mostraram contrastantes entre os diferentes grupos de fertilidade.

**Palavras-chave** Andrologia, CASA, reprodutor bovino, taxa de gestação.

## Effect of sperm motility and kinetics on fertility of Nellore bulls submitted to natural breeding season

Marina de Oliveira Silva<sup>1\*</sup>, Marcelo Sant'Ana Borges<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>1</sup>, Naiara Nantes Rodrigues<sup>1</sup>,  
Jaime Martelo Pagoto<sup>1</sup>, Leticia Padovani da Silva<sup>2</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>2</sup>, Fabio Morato  
Monteiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – Universidade Estadual Paulista, FCAV, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil;

<sup>2</sup>Instituto de Zootecnia (IZ), Centro Avançado de Pesquisa e Desenvolvimento de Bovinos de Corte, Sertãozinho, SP, Brasil.

\*E-mail: marinaoliveira.silva21@gmail.com

Automation of sperm kinetics analysis provides details about each ejaculate and it is allowing the identification of sperm subpopulations based on their movement traits. However, it is still unclear which parameters provided by the computer-assisted sperm analysis (CASA- *Computer Assisted Sperm Analysis*) contribute to a better inference of the reproductive potential of fresh and frozen semen. Therefore, the aim of the present study was to analyze and compare the motility and sperm kinetics of fresh semen from Nellore bulls with different pregnancy rates obtained from the natural breeding season (NBS). In two years of experiment, it were used 29 bulls aged between 2 and 4 years, and body weight of  $546 \pm 79$  kg. The first year was used 14 bulls and the second year was used 15 bulls. Semen collections were performed by electroejaculation, and the material collected was analyzed by CASA. The duration of NBS was three months and the average male: female ratio was 1:22 (01 bull for 22 cows in individual lots). Fertility classification of the bulls was obtained through the final result of the pregnancy rate of the NBS (90 days of duration). Bulls were classified in three groups: low pregnancy rate (LP; N=9 with 66.57%); medium pregnancy rate (MP; N=10 with 76.47%) and high pregnancy rate (HP; N=10 with 84.80%). Data were submitted to variance analysis using mixed models with the aid of the SAS program (SAS® 9.4 version), significance was declared when  $P < 0.05$ . There was no difference between bulls with low, medium and high pregnancy rates in the variables total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), rapid cells (RAP, %), amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %) and linearity (LIN, %). Bulls classified as MP and HP had sperm with higher mean path velocity (VAP;  $P=0,01$ ) ( $114.96 \pm 3.34 \mu\text{m/s}$  and  $110.98 \pm 3.34 \mu\text{m/s}$ , respectively) and straight line velocity (VLS;  $P=0,03$ ) ( $86.92 \pm 1.97 \mu\text{m/s}$  and  $87.05 \pm 1.97 \mu\text{m/s}$ , respectively) than sperm from LP bulls (VAP= $100.02 \pm 3.34 \mu\text{m/s}$  and VSL= $79.84 \pm 1.97 \mu\text{m/s}$ ). The mean value of curvilinear velocity (VCL) was similar in bulls classified as LP and HP ( $173.22 \pm 8.19 \mu\text{m/s}$  and  $190.78 \pm 8.19 \mu\text{m/s}$ , respectively), however MP bulls ( $201.40 \pm 8.19 \mu\text{m/s}$ ) were superior to LP bulls ( $P=0.02$ ) and similar to HP bulls ( $P=0.34$ ). Thus, it was concluded that the variables VAP, VSL and VCL provided by CASA can help in the choice and selection of bulls for the management of NBS, since these parameters were shown to be contrasting between the different fertility groups.

**Keywords** Andrology, bovine breeder, CASA, pregnancy rate.

## Efeitos da refrigeração, período de equilíbrio, congelação/descongelação sobre as características da motilidade espermática (CASA) em espermatozoides bovinos

Carla Patricia Teodoro de Carvalho<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>2</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>3</sup>, Gabriela Bertaiolli Zoca<sup>1</sup>, Renata Lançoni<sup>1</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes Arruda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPaR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil

\*E-mail: arrudarp@usp.br

Durante o processo congelação os espermatozoides são submetidos a mudanças de temperaturas que podem levar a alterações físicas e biológicas, com isso, afetar a sua viabilidade para a fertilização. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes etapas do processo de congelação, incluindo etapa de refrigeração (diluído até 5°C), período de equilíbrio (5°C por 1 hora) e etapa congelação/descongelação (5°C até descongelação) em espermatozoides bovinos sobre as características de motilidade espermática avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade espermática - CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Foram utilizados sete touros da raça Nelore e 41 ejaculados, com concentração final de 100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, envasados em palhetas de 0,5 mL. Em seguida, as palhetas de sêmen foram colocadas em máquina de congelação (TK 3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia de congelação Ltda, Brasil) e refrigeradas da temperatura ambiente ± 22°C até 5°C com uma curva de refrigeração de -0,25°C/min. Ao atingir a temperatura de 5°C, as amostras permaneceram por mais 60 min em estabilização (tempo de equilíbrio). Em seguida, de 5°C a -120°C, as palhetas foram congeladas com uma curva de congelação de -20°C/min. Ao atingir -120°C, foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C). As avaliações foram realizadas no sêmen diluído, 5°C, 5°C (após 1 hora em equilíbrio) e pós-descongelação quanto às seguintes características: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e células rápidas (RAP, %). Os resultados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados usando o *software* SAS. Os dados de cada avaliação de sêmen foram usados para calcular a proporção (%) de mudanças (redução ou aumento) das variáveis de espermatozoide entre cada etapa de congelação. Para calcular a proporção de mudanças observadas para cada característica do sêmen, foi utilizada a seguinte fórmula: Proporção de mudança (%) = (valor obtido no tempo B/valor obtido no tempo A x [100] - 100), sendo o momento A o início de cada etapa e o momento B sendo o final de cada etapa. Comparações envolvendo mais de uma média foram realizadas pelo teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa entre as variáveis testadas quando P<0,05. Os resultados indicam que as etapas de refrigeração, etapa de equilíbrio e etapa congelação/descongelação promoveram, respectivamente, as seguintes reduções ao longo do processo de congelação para as características de MT (-8,8%; -0,3% e -63,1%), MP (-7,0%; 0,7% e -65,2%), VAP (-4,5%, -0,3% e -17,2%), VSL (-3,2%, -0,1% e -12,9%), VCL (-6,2%, -0,3% e -19,7%), ALH (-5,8%, -1,1% e -18,3%), BCF (-2,4%, 2,0% e 10,4%), STR (1,7%, 0,3% e 5,2%), LIN (4,2%, 0,4% e 9,4%) e RAP (-8,9%, -0,3% e -64,4%). Quando observamos os resultados do processo de congelação, a etapa de congelação/descongelação foi a que mais causou redução nas características estudadas, sendo que, a etapa de equilíbrio foi a menos prejudicial para os espermatozoides. Embora as características de motilidade não sejam as únicas para medir fertilidade, espermatozoides com movimento lento ou alterado têm pouca probabilidade de atingir o oviduto, sendo razoável presumir que quanto mais células espermáticas com motilidade, maior a chance de que um deles chegue ao local de fertilização. Dessa forma, podemos concluir que, provavelmente, a somatória de mudanças que ocorrem durante as etapas de refrigeração e equilíbrio pode ter refletido em maiores alterações (redução ou aumento) das características de motilidade observadas na etapa de congelação/descongelação.

**Palavras-chave:** Espermatozoide. Processo de congelação. Refrigeração. Período de equilíbrio. Touro.

**Agradecimentos:** CAPES pelas bolsas de pós-graduação.

## Effects of cooling, equilibrium time, freezing/thawing on sperm motility characteristics (CASA) in bovine spermatozoa

Carla Patricia Teodoro de Carvalho<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>2</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>3</sup>, Gabriela Bertaiolli Zoca<sup>1</sup>, Renata Lançon<sup>1</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes Arruda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Semen Biotechnology and Andrology Laboratory - LBSA, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Physiology and Endocrinology - LFEM, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil.

\*E-mail: arrudarp@usp.br

During the freezing process, sperm are subjected to temperature changes that can lead to physical and biological changes, thereby affecting their viability for fertilization. This study aimed to evaluate the effects of different stages of the freezing process, including cooling stage (diluted up to 5°C), equilibrium time (5°C for 1 hour) and freezing/thawing stage (5°C until thawing) in bovine spermatozoa on the sperm motility characteristics evaluated by the computerized sperm motility system - CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Seven Nellore bulls and 41 ejaculates were used, with a final concentration of  $100 \times 10^6$  sperm/mL, packaged in 0.5 mL straws. After, straws were placed in a freezing machine (TK 3000®, TK Tecnologia de freezing Ltda, Brazil) and cooled from room temperature  $\pm 22^\circ\text{C}$  to 5°C with a cooling curve of  $-0.25^\circ\text{C}/\text{min}$ . Upon reaching the temperature of 5°C, the samples remained for another 60 min in stabilization (equilibrium time). Then, from 5°C to  $-120^\circ\text{C}$ , the straws were frozen with a freezing curve of  $-20^\circ\text{C}/\text{min}$ . Upon reaching  $-120^\circ\text{C}$ , they were immersed in liquid nitrogen ( $-196^\circ\text{C}$ ). Evaluations were performed in diluted semen, 5°C, 5°C (after 1 hour in equilibrium time) and post-thawing regarding the following characteristics: total motility (MT, %), progressive motility (MP, %), path velocity (VAP,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), progressive velocity (VSL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), head lateral displacement amplitude (ALH,  $\mu\text{m}$ ), beat frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), linearity (LIN, %) and rapid cells (RAP, %). The results obtained from the experimental procedures were analyzed using the *SAS software*. Data from each semen assessment were used to calculate the proportion (%) of changes (decrease or increase) in sperm variables between each freezing stage. To calculate the proportion of changes observed for each semen characteristic, the following formula was used: Proportion of change (%) = (value obtained at B time/value obtained at A time  $\times$  [100] - 100), considering A time the beginning of each stage and B time being the end of each stage. Comparisons involving more than one mean were performed using the *Tukey test*. A significant difference was considered between the variables tested when  $P < 0.05$ . The results show that the cooling, equilibrium time and freezing/thawing stage, respectively, promoted the following reductions throughout the freezing process for the MT characteristics (-8.8%; -0.3% and -63.1%), MP (-7.0%; 0.7% and -65.2%), VAP (-4.5%, -0.3% and -17.2%), VSL (-3.2%, -0.1% and -12.9%), NCV (-6.2%, -0.3% and -19.7%), ALH (-5.8%, -1.1% and -18.3%), BCF (-2.4%, 2.0% and 10.4%), STR (1.7%, 0.3% and 5.2%), LIN (4.2%, 0.4% and 9.4%) and RAP (-8.9%, -0.3% and -64.4%). When we observed the results of the freezing process, the freezing/thawing stage was the one that caused the most reduction in the characteristics studied, and the equilibrium time stage was the least harmful to the sperm. Although motility characteristics are not the only ones to measure fertility, slow moving or altered sperm are unlikely to reach the oviduct, and, it is reasonable to assume that the more motile sperm cells greater the chance that one of them will reach the site of fertilization. Thus, we can conclude that, probably, the sum of changes that occur during the cooling and equilibrium time stages may have reflected in greater alterations (reduction or increase) of the motility characteristics observed in the freezing/thawing stage.

**Keywords:** Spermatozoa. Freezing process. Cooling. Equilibrium period. Bull.

**Acknowledgments:** CAPES for the postgraduate scholarships.



## Espermio gênese alterada em um touro doador de sêmen: relato de caso

Diego Corrêa Silveira<sup>1</sup>, Marcelo Brandi Vieira<sup>1</sup>, Fábio Goularte Barreto<sup>1</sup>; Neimar Correa Severo<sup>2,3\*</sup>, Renata Lançoni<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Progen Inseminação Artificial Ltda., D. Pedrito, RS, Brasil. <sup>2</sup> Revivah Consultoria Técnica, Uberaba, MG, Brasil

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil

\*E-mail: ncsevero@gmail.com

A importância da avaliação andrológica completa de touros destinados tanto para monta natural quanto para doação de sêmen em centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) é evidenciada quando os veterinários andrologistas encontram alterações clínicas graves tais como: degeneração testicular, disfunção do epidídimo, maturidade sexual tardia, imaturidade sexual ou espermio gênese alterada. A espermio gênese é o processo final da espermatogênese no qual a espermatíde se transforma em espermatozoide. No final desse processo podem ocorrer as lesões espermáticas, especialmente no acrossoma, morfologia da cabeça, na condensação da cromatina e na formação dos vacúolos nucleares. A diferenciação entre os quadros clínicos é feita com exames andrológicos repetidos. O exame andrológico completo abrange tanto a avaliação imediata do sêmen (volume, cor, odor, motilidade/vigor, vitalidade espermática e pH) como a avaliação mediata (morfologia e concentração espermática). A avaliação morfológica indica a situação da espermio gênese nas 4 semanas anteriores a coleta do sêmen. A espermio gênese completa dura em torno de 17 dias no touro e o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo dura em torno de 11 dias, independente da frequência de coletas. Com os resultados do exame andrológico é possível identificar a qualidade seminal. As alterações graves durante a espermio gênese podem estar relacionadas a um gene autossômico recessivo. As anormalidades de acrossoma podem ser induzidas pela maturação incompleta de uma determinada população de espermatozoides. Entretanto, há casos em que ocorrem como o principal ou mesmo único defeito significativo no ejaculado e com uma frequência constante, tendo sido diagnosticado no touro como espermio gênese imperfeita. Esse quadro clínico caracteriza subfertilidade em touros. Alguns autores descrevem a espermio gênese imperfeita como uma hipo-espermatogênese de natureza congênita podendo, em alguns casos, estar acompanhada de redução do volume testicular. Segundo alguns pesquisadores, trata-se de um quadro clínico hereditário que causa infertilidade severa podendo atingir a esterilidade. Não há tratamento e os portadores devem ser eliminados da reprodução para não disseminar o problema nos seus descendentes. O presente trabalho é um relato de caso de um touro jovem doador de sêmen com 26 meses de idade, no início de regime de coletas de sêmen em um CCPS no sul do Brasil. A produção espermática deste animal durante 12 meses de coleta não sofreu nenhum tipo de alteração, apresentando sempre morfologia espermática muito alterada e razoável motilidade e vigor no exame inicial. Em 19 coletas seminais, o ejaculado deste animal apresentou em média 96% de defeitos totais, 86% de defeitos maiores e 10% de defeitos menores. Os defeitos maiores estão diretamente ligados a espermio gênese e os defeitos menores são ocasionados principalmente durante o trânsito pelo epidídimo. As características físicas de 39 ejaculados avaliados apresentaram a média de volume = 8,8 mL, motilidade inicial = 54% e concentração de espermatozoides = 997 milhões/mL, com concentração no ejaculado = 8,68 bilhões de espermatozoides. As características de volume e concentração total estavam dentro dos padrões para taurinos e suas cruzas. A motilidade encontra-se abaixo do percentual mínimo para congelamento que é de 60%. O quadro clínico desse animal demonstrou a importância do exame morfológico para avaliar a espermatogênese e principalmente o processo de diferenciação final da espermatíde em espermatozoide.

**Palavras-chave:** espermio gênese, morfologia espermática, sêmen, touro

## Altered spermiogenesis in a semen donor bull: case report

Diego Corrêa Silveira<sup>1</sup>, Marcelo Brandi Vieira<sup>1</sup>, Fábio Goularte Barreto<sup>1</sup>; Neimar Corrêa Severo<sup>2,3\*</sup>, Renata Lançoni<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Progen Inseminação Artificial Ltda., D. Pedrito, RS, Brasil. <sup>2</sup> Revivah Consultoria Técnica, Uberaba, MG, Brasil

<sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil

\*E-mail: ncsevero@gmail.com

The importance of a complete andrological evaluation of bulls destined for both natural mating and semen donation in semen collection and processing centers (SCPC), is evidenced when andrologist veterinarians find serious clinical alterations such as: testicular degeneration, epididymal dysfunction, late sexual maturity, sexual immaturity or altered spermiogenesis. Spermiogenesis is the final process of spermatogenesis in which the spermatid transforms into sperm. At the end of this process, sperm lesions can occur, especially in the acrosome, head morphology, chromatin condensation and formation of nuclear vacuoles. Differentiation between clinical conditions is made with repeated andrological examinations. The complete andrological examination encompasses both the immediate assessment of the semen (volume, color, odor, motility/vigor, sperm vitality and pH) and the mediate assessment (sperm morphology and concentration). The morphological evaluation indicates the status of spermiogenesis in the 4 weeks prior to semen collection. Complete spermiogenesis lasts around 17 days in the bull and sperm transit through the epididymis lasts around 11 days, regardless of the frequency of collections. The results of the andrological examination it is possible to identify the seminal quality. Severe changes during spermiogenesis may be related to an autosomal recessive gene. Acrosome abnormalities can be induced by incomplete maturation of a given sperm population. However, there are cases in which they occur as the main or even the only significant defect in the ejaculate and with a constant frequency, having been diagnosed in the bull as spermiogenesis imperfecta. This clinical picture characterizes subfertility in bulls. Some authors describe spermiogenesis imperfecta as a congenital hypo-spermatogenesis and, in some cases, it may be accompanied by a reduction in testicular volume. According to some researchers, it is a hereditary clinical condition that causes severe infertility and can reach sterility. There is no treatment and carriers must be eliminated from reproduction so as not to spread the problem to their descendants. The present work is a case report of a young 26-month-old semen donor bull, at the beginning of a semen collection regimen in an SCPC in southern Brazil. The sperm production of this animal during 12 months of collection did not suffer any type of alteration, always presenting very altered sperm morphology and reasonable motility and vigor in the initial examination. In 19 seminal collections, the ejaculate of this animal presented an average of 96% of total defects, 86% of major defects and 10% of minor defects. Major defects are directly linked to spermiogenesis and minor defects are caused mainly during transit through the epididymis. The physical characteristics of 39 ejaculates evaluated showed a mean volume = 8.8 mL, initial motility = 54% and sperm concentration = 997 million/mL, with an ejaculate concentration = 8.68 billion sperm. The volume and total concentration characteristics were within the standards for *Bos taurus* and its crosses. Motility is below the minimum percentage for freezing, which is 60%. The clinical case of this animal demonstrated the importance of the morphological examination to evaluate spermatogenesis and especially the process of final differentiation of the spermatid into spermatozoa.

**Keywords:** bull, semen, spermiogenesis, sperm morphology

## Existe alguma relação entre a temperatura escrotal, a ecogenicidade testicular e a qualidade do sêmen em touros Nelore?

Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>, Máira Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Shirley Andrea Florez-Rodriguez<sup>1</sup>, Vitor Hugo Guilger Gonzaga<sup>1</sup>, Vinícius José Moreira Nogueira<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Flávia Santos Almeida<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>

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

\*E-mail: celeghin@usp.br

A inclusão da avaliação da temperatura média da superfície escrotal (TMSE) e da ultrassonografia testicular (US) na avaliação andrológica pode garantir melhor diagnóstico do potencial de fertilização em touros. No entanto, ainda não está bem estabelecido quais informações estão relacionadas com a qualidade do sêmen (QS) e consequentemente com o potencial de fertilização. Neste estudo, foi investigada a relação entre a TMSE, a US e a QS. Para isso, foram avaliados 36 ejaculados de nove touros da raça Nelore, incluindo avaliações da TMSE e da US testicular no exame andrológico. A colheita de sêmen foi realizada por eletroejaculação (Autojac V2, Neovet, Uberaba, MG-Brasil). Em seguida, o sêmen foi avaliado quanto às características de motilidade espermática (CASA), morfologia espermática (%), classificados em defeitos maiores e menores, por DIC), integridade espermática das membranas plasmática e acrossômica e potencial de membrana mitocondrial (%), utilizando sondas fluorescência, por microscopia de epifluorescência). Com base nas características espermáticas, os ejaculados foram separados em dois grupos: qualidade espermática satisfatória (SAT; n=21): <20% dos defeitos maiores, <30% dos defeitos totais e >60% da motilidade total; e qualidade espermática insatisfatória (UNS; n=15): ≥20% dos defeitos maiores, ≥30% do total de defeitos e ≤60% da motilidade total. O exame termográfico da temperatura média da superfície escrotal (TMSE) foi o primeiro exame realizado, utilizando a câmera termográfica modelo T620 (FLIR Systems, EUA). Durante o exame termográfico, a temperatura retal (TR) foi aferida com termômetro digital. A termografia foi feita com distância de 0,9 m entre a área e a câmera. As imagens foram analisadas pelo *software* FLIR Quick Report<sup>®</sup>. O parênquima testicular foi avaliado por meio de equipamento de ultrassonografia (M5Vet<sup>®</sup>, Mindray, China) com transdutor linear em 8MHz, em modo B. O tecido testicular foi classificado em escores de acordo com a morfoecogenicidade, considerando: a homogeneidade (escores de 0 a 2, sendo 0 referente ao parênquima testicular homogêneo e 2 o mais heterogêneo) e a presença de pontos hiperecoicos (escores de 0 a 3, sendo 0 referente à ausência de pontos hiperecoicos e 3 à presença intensa de pontos hiperecoicos). A análise estatística foi realizada por análise de variância pelo procedimento MIXED do *software* SAS considerando dois grupos (grupos SAT e UNS). Os grupos foram comparados quanto a termografia, ultrassonografia e características espermáticas. A diferença foi considerada significativa quando  $P \leq 0,05$ . Ejaculados do grupo QS satisfatório (SAT) apresentaram maior qualidade das características espermáticas do que ejaculados do grupo qualidade espermática insatisfatória (UNS). O parênquima testicular do grupo UNS apresentou maior ( $P = 0,04$ ) quantidade de pontos hiperecoicos ( $0,20 \pm 0,09$  vs  $0,02 \pm 0,02$ ) e tendeu a ser menos ( $P=0,08$ ) homogêneo ( $0,06 \pm 0,04$  vs  $0 \pm 0$ ) do que o grupo SAT. Nenhuma diferença foi observada para TMSE entre os grupos SAT e UNS. Assim, podemos concluir que a quantidade de pontos hiperecoicos no tecido testicular está relacionada com a qualidade do sêmen em touros, mas não estão relacionados com TMSE, pelo menos neste momento da avaliação.

**Palavras-chave:** Bovinos; Ultrassonografia testicular; Termografia infravermelha; Ecogenicidade.

## Is there any relationship between scrotal temperature, testicular echogenic and semen quality in Nelore bulls?

Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>1\*</sup>, Maíra Bianchi Rodrigues Alves<sup>1</sup>, Rubens Paes de Arruda<sup>2</sup>, Leonardo Batissaco<sup>1</sup>, Shirley Andrea Florez-Rodriguez<sup>1</sup>, Vitor Hugo Guilger Gonzaga<sup>1</sup>, Vinícius José Moreira Nogueira<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia-Oliveros<sup>1</sup>, Flávia Santos Almeida<sup>1</sup>, Thais de Oliveira Cardoso Silva<sup>1</sup>

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

\*E-mail: celeghin@usp.br

The inclusion on the breeding soundness evaluation (BSE) of the examination of scrotal surface mean temperature (SSMT) and testicular ultrasound (US) features could ensure a better diagnosis of the status of fertilization potential in bulls. However, it is not well established, yet which information is related with semen quality (SQ) and consequently with fertilization potential. In this study, the relationship between SSMT, US and SQ were investigated. For this, 36 ejaculates from nine Nelore bulls were evaluated including SSMT and US evaluations in the BSE. Semen collection was performed by electroejaculation (Autojac V2, Neovet, Uberaba, MG-Brazil). Afterwards, semen was evaluated to sperm motility characteristics (CASA), sperm abnormalities (%), major and minor defects, DIC), and sperm integrity of plasma and acrosome membranes and mitochondrial membrane potential (%), using fluorescent probes by epifluorescence microscopy). Based on sperm characteristics, the ejaculates were separated into two groups: satisfactory sperm quality (SAT; n=21): <20% of major defects, <30% of total defects and >60% of total motility; and unsatisfactory sperm quality (UNS; n=15): ≥20% of major defects, ≥30% of total defects and ≤60% of total motility. Thermography exam of scrotal surface mean temperature (SSMT) was the first examination performed, using the T620 model (FLIR Systems, USA) thermographic camera. During the thermographic exam, rectal temperature (RT) was measured with a digital thermometer. The thermography was performed with a distance of 0.9 m between the area and the camera. The images were analyzed by the FLIR Quick Report<sup>®</sup> software. Testicular parenchyma was evaluated in B-mode using ultrasound (M5Vet<sup>®</sup>, Mindray, China) equipped with 8MHz linear probe. Testicular tissue was evaluated in scores related to mophoechogenicity, the features evaluated were: homogeneity (0-2, being 0 more homogeneous and 2 more heterogeneous) and presence of hyperechoic points (0-3, being 0 absent hyperechoic points and 3 intense presence of hyperechoic points). Statistical analysis was performed by analysis of variance by the MIXED procedure of SAS software considering two groups (SAT and UNS groups). The groups were compared in concern to thermography, ultrasonography and sperm characteristics. The difference was considered significant when P<0.05. Ejaculates of the satisfactory SQ group (SAT) presented higher quality of sperm characteristics than ejaculates of unsatisfactory sperm quality group (UNS). Testicular tissues of UNS had a greater (P = 0.04) quantity of hyperechoic points (0.20±0.09 vs 0.02 ± 0.02) and tended to be (P=0.08) less homogenous (0.06 ± 0.04 vs 0 ± 0) than did SAT. No difference was observed for SSMT between the SAT and UNS groups. Thus, we can conclude that the quantity of hyperechoic points on testicular tissue is related with semen quality in bulls, but they are not related to SSMT, at least within the assessed interval.

**Key-words:** Bovine; Testicular ultrasonography; Infrared thermography; Echogenicity.

## Importância do conforto térmico e da nutrição na qualidade espermáticas de touros Angus

Giovanna do Prado Ribeiro<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Henry David Mogollón Garcia<sup>1</sup>, Gabriella Costa Ribeiro<sup>2</sup>, Jaqueline Cândido Carvalho<sup>1,3</sup>, Cinthia Medeiros Barriveira<sup>4</sup>, Isabele Picada Emanuelli<sup>4</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Clínica Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil <sup>3</sup>Universidade Santo Amaro; <sup>4</sup>Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde. Instituto Cesumar de Ciências Tecnologia –UniCesumar, Maringá, PR, Brasil

\*E-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

A espermatogênese bovina, evento cíclico e cronológico de formação dos espermatozoides, dura aproximadamente 60 dias. O plano nutricional e o conforto térmico, essenciais à eficiência deste processo, quando comprometidos, afetam a produção e a morfologia espermáticas. O objetivo deste resumo foi relatar a recuperação da qualidade seminal e circunferência escrotal (CE) de 7 touros Angus de 28 meses de idade mantidos sob restrição hídrica e alimentar (ambos pela falta de chuva na região), e sem acesso à sombra em uma propriedade em Guaraniaçu-PR (índice temperatura umidade - ITU =  $73,6 \pm 0,3$ ). Após serem mantidos por 61 dias nesta condição, os animais foram transferidos para outra propriedade em Mandaguaçu-PR (ITU =  $72,2 \pm 0,3$ ), onde permaneceram acomodados em piquete (150 m<sup>2</sup>) com fornecimento de dieta balanceada para engorda, água *ad libitum* e sombra natural. Os touros foram submetidos a coletas de sêmen por eletroejaculação em três momentos: dia 2 (dia zero (D0) = dia de chegada à nova propriedade), D33 e D76. Foram avaliadas a circunferência escrotal (CE), motilidade e a morfologia espermáticas (coloração panótica). A comparação entre os momentos foi realizada pelo modelo de efeito misto usando-se o teste de Tukey. A porcentagem de defeitos menores não diferiu estatisticamente entre os momentos (D2 =  $8,9 \pm 2,1$ ; D33 =  $9,6 \pm 1,7$  e D76 =  $6,7 \pm 0,4\%$ ;  $P > 0,05$ ). Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os momentos D2 e D76 na CE ( $36,7 \pm 0,6$  vs  $39,7 \pm 0,8$  cm), motilidade espermática ( $59,3 \pm 6,2$  vs  $76 \pm 4,0\%$ ), defeitos maiores ( $51,7 \pm 4,3$  vs  $27,3 \pm 5,0\%$ ) e defeitos totais ( $60,6 \pm 5,7$  vs  $34 \pm 5,0\%$ ). A adequação do plano nutricional e o melhor conforto térmico resultaram na recuperação da qualidade seminal, exceto pela porcentagem de defeitos totais, que apesar de ter diminuído, permaneceu elevada. Estes resultados demonstraram a importância do conforto térmico e do atendimento das demandas nutricionais para a espermatogênese.

**Palavras-chaves:** Morfologia, motilidade, espermatozoide, testículos, reprodução

**Agradecimentos:** CAPES (fomento nº 0001) e FAPESP (processo nº 2021/15556-8).

## Importance of thermal comfort and nutrition on sperm quality in Angus bulls

Giovanna do Prado Ribeiro<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Henry David Mogollón Garcia<sup>1</sup>, Gabriella Costa Ribeiro<sup>1</sup>, Jaqueline Cândido Carvalho<sup>1,3</sup>, Cíntia Medeiros Barriveira<sup>4</sup>, Isabele Picada Emanuelli<sup>4</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.; <sup>2</sup>Department of Veterinary Clinical Science, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil; <sup>3</sup>Santo Amaro University; <sup>4</sup>Department of Biological Science and Health – UniCesumar, Maringá, PR, Brasil  
\*E-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

Bovine spermatogenesis, a cyclical and chronological event of sperm formation, lasts around 60 days. Poor nutritional plan and heat stress affect sperm production and morphology. The objective of this abstract was to report the recovery of seminal quality and scrotal circumference (SC) of seven 28 months Angus bulls kept under water and food restriction (dry period), without access to shade in a property in Guaraniaçu-PR (temperature-humidity index - THI =  $73.6 \pm 0.3$ ). After being kept for 61 days in this condition, the animals were transferred to another property in Mandaguaçu-PR (THI =  $72.2 \pm 0.3$ ), where they were kept in a paddock (150 m<sup>2</sup>) with natural shade and fed a fattening ration and water *ad libitum*. The bulls were submitted to semen collection by electroejaculation three times: day 2 (day zero (D0) = day of arrival at the new property), D33, and D76. Scrotal circumference (SC), motility, and sperm morphology (panoptic stain) were evaluated. The comparison between moments was performed by the mixed effect model using Tukey's test. The percentage of minor defects did not differ between the moments (D2 =  $8.9 \pm 2.1$ ; D33 =  $9.6 \pm 1.7$  and D76 =  $6.7 \pm 0.4$ %;  $P > 0.05$ ). There was a significant difference ( $P < 0.05$ ) between moments D2 and D76 in SC ( $36.7 \pm 0.6$  vs  $39.7 \pm 0.8$  cm) and sperm motility ( $59.3 \pm 6.2$  vs  $76 \pm 4.0$ %), major ( $51.7 \pm 4.3$  vs  $27.3 \pm 5.0$ %) and total ( $60.6 \pm 5.7$  vs  $34 \pm 5.0$ %) defects. The adequacy of the nutritional plan and the best thermal comfort resulted in the recovery of seminal quality, except for the percentage of total sperm defects that remained high. These results demonstrated the importance of thermal comfort and a proper nutritional plan for spermatogenesis.

**Keywords:** Morphology, motility, spermatozoa, testicle, reproduction

**Acknowledgements:** CAPES (Grant # 0001) e FAPESP (Grant # 2021/15556-8).

## Mesotelioma da túnica vaginal em touro: relato de caso

João Pedro Brandão Zandonaide<sup>1,2\*</sup>; Solange Martins Almeida<sup>1</sup>; Paulo Henrique Zaiden Paro<sup>3</sup>; Bruna de Souza Teixeira<sup>3</sup>; Neimar Correa Severo<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Alta Genetics do Brasil Ltda., Uberaba, MG. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG. <sup>3</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade de Uberaba (Uniube), Uberaba, MG. <sup>4</sup>Revivah Consultoria Técnica, Uberaba, MG

\*E-mail: joao.zandonaide@gmail.com

Os mesoteliomas podem ser tumores benignos ou, mais comumente, malignos derivados de células mesoteliais que revestem as cavidades peritoneal, pleural ou pericárdica. As células mesoteliais têm potencial para se desenvolverem como células epiteliais ou mesenquimais e, os mesoteliomas geralmente contêm componentes epitelióides e mesenquimatosos em proporções variáveis, conforme indicado pela coloração imunohistoquímica positiva para os filamentos intermediários citoqueratina e vimentina. Os mesoteliomas da túnica vaginal, uma extensão da cavidade peritoneal, têm as mesmas características histológicas de outros locais. O mesotelioma da túnica vaginal é um tumor originado de células mesoteliais que revestem os folhetos visceral e parietal do testículo, extremamente raro em humanos e espécies domésticas. Em humanos, existem poucos relatos do tumor na túnica vaginal de forma isolada. Em cães, poucos estudos relataram mesoteliomas na túnica vaginal. Em garanhões, a literatura relata um caso raro de mesotelioma na túnica vaginal. Em bovinos encontramos relatos de caso de mesotelioma na túnica vaginal, isolado ou associado a lesões peritoneais. Na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) de tumores em humanos e animais domésticos, o mesotelioma foi classificado em subtipos epitelióide, sarcomatóide (fibroso, sarcomatoso) e bifásico (misto), dependendo do epitelióide predominante e/ou componente da célula mesotelial fusiforme. As estruturas tumorais na túnica vaginal de touros foram diagnosticadas como mesotelioma predominantemente sarcomatóide, com base em achados macroscópicos e histológicos. A associação entre mesoteliomas e exposição a fibras de amianto em humanos é bem conhecida, mas não foi confirmada em animais. Neste relato descrevemos o caso de um touro da raça Nelore de 5 anos de idade alojado em um centro de coleta e processamento de sêmen (CCPS) que apresentou acentuado aumento de volume do lado direito do escroto. Na avaliação física geral o animal não apresentava alteração nos parâmetros vitais e na avaliação especial do aparelho reprodutor, além do aumento de volume, à palpação era firme, não sendo possível examinar o testículo e estruturas adjacentes. Não havia alteração na temperatura local e o animal não apresentava sensibilidade dolorosa local. A avaliação do sêmen revelou diminuição do número de espermatozoides no ejaculado com redução da motilidade e aumento de alterações morfológicas dos espermatozoides. Após avaliação ultrassonográfica, observou-se edema hidrocélico anecóico envolvendo o testículo, epidídimo e funículo direitos. O testículo apresentava-se com forma, contorno e ecotextura normais, porém o mediastino não era evidente. Nenhuma alça intestinal foi observada descendo pelo canal inguinal para o escroto. O testículo e o epidídimo esquerdo apresentavam-se com ecotextura normal. O fluido em torno do testículo direito indicava hidrocele escrotal unilateral. O testículo, epidídimo e túnica vaginal direita foram removidos cirurgicamente e realizado exame macroscópico e histológico. Ao exame macroscópico, foram encontrados nódulos acastanhados com 0,4 cm na túnica vaginal e aderências da camada visceral com o testículo. Histopatologicamente, os nódulos consistiam em células neoplásicas papilares que invadiram o tecido circundante. Imuno-histoquimicamente, as células neoplásicas foram difusamente positivas para vimentina e citoqueratina. Com base nesses achados, o tumor foi diagnosticado como mesotelioma sarcomatóide. Este é o primeiro relato de caso de mesotelioma na túnica vaginal em touro doador de sêmen em um CCPS no Brasil. De acordo com a literatura, o mesotelioma é um tumor raro nos animais domésticos e com base no exame histopatológico e imunohistoquímico o diagnóstico para o caso descrito foi mesotelioma maligno de diferenciação predominantemente mesenquimal.

**Palavras-chave:** mesotelioma sarcomatóide, imunohistoquímica, túnica vaginal, touro

## Mesothelioma in the tunica vaginalis in bull - case report

João Pedro Brandão Zandonaide<sup>1,2\*</sup>; Solange Martins Almeida<sup>1</sup>; Paulo Henrique Zaiden Paro<sup>3</sup>; Bruna de Souza Teixeira<sup>3</sup>; Neimar Correa Severo<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Alta Genetics do Brasil Ltda., Uberaba, MG. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG. <sup>3</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade de Uberaba (Uniube), Uberaba, MG. <sup>4</sup>Revivah Consultoria Técnica, Uberaba, MG

\*E-mail: joao.zandonaide@gmail.com

Mesotheliomas can be benign or, more commonly, malignant tumors derived from mesothelial cells lining the peritoneal, pleural, or pericardial cavities. Mesothelial cells have the potential to develop as epithelial or mesenchymal cells, and mesotheliomas generally contain epithelioid and mesenchymal components in varying proportions, as indicated by positive immunohistochemical staining for cytokeratin and vimentin intermediate filaments. Tunica vaginalis mesotheliomas, an extension of the peritoneal cavity, have the same histological features as other sites. Tunica vaginalis mesothelioma is a tumor originating from mesothelial cells lining the visceral and parietal layers of the testis, extremely rare in humans and domestic species. In humans, there are few reports of the tumor in the tunica vaginalis in isolation. In dogs, few studies have reported mesotheliomas in the tunica vaginalis. In stallions, the literature reports a rare case of mesothelioma in the tunica vaginalis. In cattle, we found case reports of mesothelioma in the tunica vaginalis, isolated or associated with peritoneal lesions. In the World Health Organization (WHO) classification of tumors in humans and domestic animals, mesothelioma has been classified into epithelioid, sarcomatoid (fibrous, sarcomatous) and biphasic (mixed) subtypes, depending on the predominant epithelioid and/or fusiform mesothelial cell component. The tumor structures in the tunica vaginalis of bulls were diagnosed as predominantly sarcomatoid mesothelioma, based on macroscopic and histological findings. The association between mesotheliomas and exposure to asbestos fibers in humans is well known but has not been confirmed in animals. A 5-year-old Nellore bull housed in a semen collection and processing center (CCPS) showed a marked increase in volume on the right side of the scrotum. In the general physical evaluation, the animal did not present alterations in the vital parameters and in the special evaluation of the reproductive system, in addition to the increase in volume, it was firm on palpation, and it was not possible to examine the testicle and adjacent structures. There was no change in local temperature and the animal had no local pain sensitivity. The semen evaluation revealed a decrease in the number of spermatozoa in the ejaculate with reduced motility and increased morphological alterations of the sperm. After ultrasound evaluation, anechoic hydroceleic edema was observed involving the right testis, epididymis and funiculus. The testis had a normal shape, contour and echotexture, but the mediastinum was not evident. No intestinal loop was observed descending through the inguinal canal into the scrotum. The testis and the left epididymis had normal echotexture. Fluid around the right testicle indicated unilateral scrotal hydrocele. The testis, epididymis and right tunica vaginalis were surgically removed and a macroscopic and histological examination was performed. On macroscopic examination, brownish nodules measuring 0.4 cm were found in the tunica vaginalis and adhesions of the visceral layer with the testis. Histopathologically, the nodules consisted of neoplastic papillary cells that had invaded the surrounding tissue. Immunohistochemically, neoplastic cells were diffusely positive for vimentin and cytokeratin. Based on these findings, the tumor was diagnosed as sarcomatoid mesothelioma. This is the first case report of mesothelioma in the tunica vaginalis in a sperm donor bull in a CCPS in Brazil. According to the literature, mesothelioma is a rare tumor in domestic animals and based on the histopathological and immunohistochemical examination, the diagnosis for the case described was malignant mesothelioma of predominantly mesenchymal differentiation.

**Keywords:** sarcomatoid mesothelioma, immunohistochemistry, tunica vaginalis, bull



## Mesotelioma peritoneal e escrotal de origem desconhecida em um touro doador de sêmen: relato de caso

Neimar Correa Severo<sup>1,2</sup>, Adolfo Firmo Ferreira<sup>3</sup>, Ricardo Araújo Micai<sup>3</sup>, Ana Clara Faquinesi Cavalcante<sup>3</sup>, Geison Morel Nogueira<sup>2</sup>, Mônica Horr<sup>4</sup>, Renata Lançoni<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Revivah Consultoria Técnica, Uberaba, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

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

Mesoteliomas são tumores das células mesoteliais que revestem as membranas serosas e seus tecidos de suporte de origem mesodérmica. Esses tumores foram relatados em humanos, cães e bovinos; até agora, eles têm sido considerados uma condição rara. Em bovinos, as lesões epitelióides afetam principalmente o peritônio e podem se espalhar secundariamente para outras cavidades celômicas. Neste relato de caso, descrevemos o mesotelioma peritoneal e escrotal em um touro jovem, da raça Nelore, com 3,4 anos de idade, alojado em um centro de coleta e processamento de sêmen (CCPS) no Brasil. Antes do início dos sintomas, o touro apresentava espermograma com valores médios de: volume = 5 mL, concentração =  $1.040 \times 10^6$  espermatozoides/mL, motilidade = 80%, vigor = 5. Na análise da morfologia espermática % de defeitos maiores = 1 - 3 % e defeitos menores = 5 - 10%. O animal apresentou aumento de volume e sensibilidade dolorosa à palpação em região do escroto. Foi instituído tratamento com anti-inflamatórios, diurético e não houve melhora no quadro clínico. Posteriormente ao aparecimento dos sintomas houve alteração nos valores do espermograma: volume = 5 mL, concentração:  $500 \times 10^6$  espermatozoides/mL, motilidade = 53%, vigor = 3, defeitos maiores = 5 - 10%, defeitos menores = 10%, podendo-se notar, a princípio, diminuição considerável na motilidade, vigor e concentração espermática e, aumento dos defeitos maiores. O touro apresentava valores de AST (TGO) e albumina abaixo dos valores de referência (59 U/L e 2,23 g/dL) e creatinina, Gama GT e ureia dentro da normalidade. O hemograma revelou leve aumento de leucócitos segmentados, monócitos reativos, acantócitos, anisocitose (+++), agregação plaquetária discreta e policitemia (++). Foi realizado exame ultrassonográfico e detectado grande quantidade de conteúdo anecogênico na cavidade escrotal. Neste momento foi procedido cêntese da bolsa testicular, guiada pelo US e detectado hematocele. Observou-se ainda que o aumento de volume se tornou mais acentuado, havia assimetria escrotal e o animal apresentava extrema sensibilidade e dor na região do funículo espermático e bolsa testicular. Diante disso, indicou-se a castração unilateral e neste procedimento, retirou-se amostra para realização do histopatológico, onde foi detectado “neoplasia maligna fusocelular, morfológicamente sugestivo de mesotelioma de células fusiformes ou sarcoma fusocelular pouco diferenciado”. Após este diagnóstico ainda houve a tentativa de manter o touro em central para processamento do sêmen, porém o animal apresentava baixa qualidade espermática, passou para queda do apetite, piora do estado clínico geral, aumento abdominal e o lado remanescente do escroto começou a aumentar em tamanho, com flutuação à palpação local. Então, o touro foi encaminhado novamente ao hospital veterinário e realizou-se paracentese e laparotomia para coleta de material para histopatológico. O quadro levou a decisão de eutanásia. O exame anatomopatológico identificou como alterações macroscópicas: sugestivo de Mesotelioma metastático difuso; Pleurite focalmente extensa acentuada; Neoplasia testicular e Fibrose; Tiflíte ulcerativa multifocal discreta; Hidrotórax e Hidroperitônio. O interesse pelo estudo de casos de mesotelioma aumentou desde que a associação entre a exposição às fibras de amianto e mesoteliomas em humanos foi demonstrado. As fibras de amianto são suspeitas de desempenhar um papel etiológico no desenvolvimento do mesotelioma peritoneal também em bovinos. Portanto, tem sido fortemente sugerido que os bovinos devem ser considerados sentinelas valiosas para a identificação de perigos decorrentes da exposição ao amianto para a saúde humana. Foi relatado que o envolvimento da túnica vaginal pode se desenvolver como resultado da disseminação do peritônio através do anel inguinal. O mesotelioma escrotal foi descrito em outros estudos, mas até onde se sabe, este é o primeiro caso de mesotelioma envolvendo a túnica vaginal e o peritônio. Os mesoteliomas podem ser difíceis de serem diferenciados da proliferação inflamatória de células mesoteliais, adenocarcinoma pleural e disseminação peritoneal de cistoadenocarcinoma seroso de origem ovariana. Os mesoteliomas também apresentam semelhança clínica com a tuberculose peritoneal (“doença da pérola”) e, em alguns casos, podem mimetizar metástases peritoneais de alguns outros tumores primários. Portanto, é possível que a falta de diagnóstico de mesotelioma no passado possa ser devido a problemas de identificação durante o exame post-mortem, juntamente com a escassez de sintomas no animal vivo. Por outro lado, a curta vida produtiva dos animais de produção, principalmente o gado de corte, e o escasso interesse e/ou benefício econômico em realizar todos os exames necessários para chegar a um diagnóstico e possivelmente tratar um animal de fazenda doente em vez de abatê-lo provavelmente contribuirá para a baixa prevalência relatada dessa neoplasia de desenvolvimento lento e muitas vezes silenciosa.

**Palavras-chave:** neoplasia, bovino, patologia reprodutiva, andrologia.

## Peritoneal and scrotal mesothelioma of unknown origin in a sperm donor bull: case report

Neimar Correa Severo<sup>1,2</sup>, Adolfo Firmo Ferreira<sup>3</sup>, Ricardo Araújo Micaí<sup>3</sup>, Ana Clara Faquineli Cavalcante<sup>3</sup>, Geison Morel Nogueira<sup>2</sup>, Mônica Horr<sup>4</sup>, Renata Lanconi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Revivah Consultoria Técnica, Uberaba, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil

<sup>3</sup> Pecplan ABS Importação e Exportação LTDA., Delta, MG, Brasil.

<sup>4</sup> Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

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

Mesotheliomas are tumors of the mesothelial cells lining the serous membranes and their supporting tissues of mesodermal origin. These tumors have been reported in humans, dogs and bovine; until now, they have been considered a rare condition. In bovine, epithelioid lesions primarily affect the peritoneum and may spread secondarily to other coelomic cavities. In this case report, we describe peritoneal and scrotal mesothelioma in a young Nelore bull, aged 3.4 years, housed in a semen collection and processing center in Brazil. Before the onset of symptoms, the bull had a spermogram with mean values of: volume = 5 mL, concentration =  $1,040 \times 10^6$  sperm/mL, motility = 80%, vigor = 5. In the analysis of sperm morphology % of major defects = 1 - 3 % and minor defects = 5 - 10%. The animal presented increased volume and painful sensitivity to palpation in the scrotum region. Treatment with anti-inflammatories and diuretics was instituted and there was no improvement in the clinical picture. After the onset of symptoms, there was a change in the spermogram values: volume = 5 mL, concentration:  $500 \times 10^6$  sperm/mL, motility = 53%, vigor = 3, major defects = 5 - 10%, minor defects = 10%, and it is noted, at first, a considerable decrease in motility, vigor and sperm concentration and an increase in major defects. The bull had AST (TGO) and albumin values below the reference values (59 U/L and 2.23 g/dL) and creatinine, Gamma GT and urea within the normal range. The hemogram revealed a slight increase in segmented leukocytes, reactive monocytes, acanthocytes, anisocytosis (+++), mild platelet aggregation and polychromasia (++). Ultrasound examination was performed and a large amount of anechoic content was detected in the scrotal cavity. At this moment, scrotal centesis was performed, guided by US and a hematocele was detected. It was also observed that the increase in volume became more accentuated, there was scrotal asymmetry and the animal presented extreme sensitivity and pain in the region of the spermatic cord and scrotum. In view of this, unilateral castration was indicated and in this procedure, a sample was removed for histopathology, where "malignant spindle cell neoplasm, morphologically suggestive of spindle cell mesothelioma or poorly differentiated spindle cell sarcoma" was detected. After this diagnosis, there was still an attempt to keep the bull in a center for semen processing, but the animal had low sperm quality, began to lose appetite, worsened its general clinical status and increased abdominal size. Then, the bull was referred again to the veterinary hospital and paracentesis was performed. The situation led to the decision of euthanasia. The anatomopathological examination identified as macroscopic alterations: suggestive of diffuse metastatic Mesothelioma; Marked focally extensive pleuritis; Testicular Neoplasm and Fibrosis; Mild multifocal ulcerative typhitis; Hydrothorax and Hydroperitoneum. Interest in the study of mesothelioma cases has increased since the association between exposure to asbestos fibers and mesothelioma in humans was demonstrated. Asbestos fibers are suspected to play an etiological role in the development of peritoneal mesothelioma also in bovine. Therefore, it has been strongly suggested that bovine should be considered valuable sentinels for the identification of human health hazards arising from asbestos exposure. It has been reported that involvement of the tunica vaginalis can develop as a result of the peritoneum spreading through the inguinal ring. Scrotal mesothelioma has been described in other studies, but to the best of our knowledge, this is the first case of mesothelioma involving the tunica vaginalis and peritoneum. Mesotheliomas can be difficult to differentiate from inflammatory mesothelial cell proliferation, pleural adenocarcinoma, and peritoneal spread of serous cystadenocarcinoma of ovarian origin. Mesotheliomas also have a clinical resemblance to peritoneal tuberculosis and, in some cases, can mimic peritoneal metastases from some other primary tumors. Therefore, it is possible that the lack of mesothelioma diagnosis in the past could be due to identification problems during the post-mortem examination, along with the dearth of symptoms in the live animal. On the other hand, the short productive life of production animals, especially beef cattle, and the little interest and/or economic benefit in carrying out all the tests necessary to reach a diagnosis and possibly treat a sick farm animal instead of killing it will likely contribute to the reported low prevalence of this slow-developing and often silent neoplasm.

**Keywords:** neoplasm, bovine, reproductive pathology, andrology.

## Perfil sérico do hormônio antimülleriano na peripuberdade de touros Nelore

Jair de Albuquerque Pereira<sup>1</sup>, Thiago Mendes de Almeida<sup>1</sup>, Romulo Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Samara Cristina Costa Pinto<sup>2</sup>, Rafael Augusto Satrapa<sup>1</sup>, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes<sup>3</sup>, Vivian Rotuno Moure<sup>4</sup>, Glauco Valdameri<sup>4</sup>, Luciane Maria Laskoski<sup>5</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – UFAC, Rio Branco, AC, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – USP/FMVZ, SP, Brasil, <sup>3</sup>UFTO, TO, Brasil, <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR, PR, Brasil; <sup>5</sup>Curso de Medicina Veterinária – UFPR, PR, Brasil

\*E-mail: fernando.andrade@ufpr.br

Objetivou-se avaliar as concentrações séricas do hormônio antimülleriano (AMH) em tourinhos Nelore na peripuberdade, correlacionando-as com as variáveis andrológicas. Foram selecionados 8 tourinhos de 8 meses de idade, todos contemporâneos, sendo avaliados quanto ao desenvolvimento sexual por 150 dias, sendo os dias -60, -30, 0, +30 e +60, os meses 8, 9, 10, 11 e 12 de idade, respectivamente. Estes 8 animais foram selecionados dentro de um grupo de 30, aqueles que apresentaram pelo menos  $50 \times 10^6$  de Sptz/mL e 10% de motilidade progressiva, pela primeira vez, tinha a puberdade confirmada, sendo então alocados dentro das unidades experimentais. Segundo a classificação adota, estes animais apresentaram puberdade aos 10 meses de idade. As coletas seminais foram realizadas por eletroejaculação, avaliando-se o sêmen segundo os critérios do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, por meio de microscopia óptica. Os valores de AMH foram correlacionados com as avaliações espermática por meio do PROC CORR Spermman do programa SAS (1992) e as médias das concentrações do antimülleriano comparadas entre si pelo teste de Friedman. As médias de peso corporal (kg) e circunferência escrotal (cm) para o período das cinco avaliações (-60 a +60) foram de  $244,5 \pm 11,4$  e  $16,75 \pm 1,25$ ,  $250,75 \pm 12,5$  e  $17,62 \pm 1,375$ ,  $259,37 \pm 13,62$  e  $18,65 \pm 1,37$ ,  $271,25 \pm 15,75$  e  $19,75 \pm 1,00$  e  $283,5 \pm 18,00$  e  $20,75 \pm 1,50$ , respectivamente. Quanto as avaliações seminais, contabilizaram-se apenas os momentos que foram determinados com a puberdade (0, +30 e +60), tendo valores, dentro desses períodos, para motilidade (%), concentração ( $\times 10^6$ ) e defeitos maiores (%) e menores (%) do sêmen de  $11,25 \pm 1,8$ ,  $167,5 \pm 20$ ,  $43,65 \pm 5,2$  e  $4,65 \pm 0,9$ ;  $51,85 \pm 0,9$ ,  $270 \pm 14,2$ ,  $20,35 \pm 4,7$  e  $8,12 \pm 134,44$ ;  $67,5 \pm 6,9$ ,  $398,75 \pm 24,6$ ,  $7,87 \pm 1,6$  e  $13,75 \pm 3,1$ , respectivamente. As concentrações séricas (pmol/L) do AMH foram determinadas por kit ELISA (AL-114/AnshLabs®). Os valores médios para AMH dentro dos períodos de -60, -30, 0, +30 e +60 foram de  $611,35 \pm 200,02$ ,  $554,94 \pm 393,16$ ,  $621,61 \pm 285,15$ ,  $370,36 \pm 134,44$  e  $51,65 \pm 17,80$ , respectivamente. Observou-se que as concentrações de AMH declinaram a partir da puberdade, havendo significância ( $p < 0,05$ ) 60 dias após o início da puberdade, não havendo correlação com as variáveis andrológicas analisadas. Desta maneira, não sendo boa ferramenta para predizer, precocemente, o momento da puberdade em tourinhos Nelore.

**Palavras-chave:** AMH; *Bos indicus*; Puberdade; Tourinhos.

## Serum anti-Müllerian hormone profile in peripubertal Nelore bulls

Jair de Albuquerque Pereira<sup>1</sup>, Thiago Mendes de Almeida<sup>1</sup>, Romulo Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Vivian Rotuno Moure<sup>2</sup>,  
Glaucio Valdameri<sup>2</sup>, Luciane Maria Laskoski<sup>3</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>3\*</sup>

1 Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – UFAC, Rio Branco, AC, Brasil; 2 Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR, PR, Brasil; 3 Curso de Medicina Veterinária – UFPR, PR, Brasil

\*E-mail: fernando.andrade@ufpr.br

The objective was to evaluate the serum concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) in Nelore bulls in peripuberty, correlating them with andrological variables. Eight bulls of 8 months of age, all contemporaries, were evaluated for sexual development for 150 days, with days -60, -30, 0, +30 and +60, the months 8, 9, 10, 11 and 12 of age, respectively. These 8 animals were selected from a group of 30, those that presented at least  $50 \times 10^6$  of Sptz/mL and 10% of progressive motility, for the first time, had puberty confirmed, being then allocated within the experimental units. According to the adopted classification, these animals had puberty at 10 months of age. Seminal collections were performed by electroejaculation, and the semen was evaluated according to the criteria of the Brazilian College of Animal Reproduction, by means of optical microscopy. The AMH values were correlated with the sperm evaluations using the PROC CORR Sperm of the SAS program (1992) and the means of the anti-Müllerian concentrations were compared with each other by the Friedman test. The means of body weight (kg) and scrotal circumference (cm) for the period of the five evaluations (-60 to +60) were  $244.5 \pm 11.4$  and  $16.75 \pm 1.25$ ,  $250.75 \pm 12.5$  and  $17.62 \pm 1.375$ ,  $259.37 \pm 13.62$  and  $18.65 \pm 1.37$ ,  $271.25 \pm 15.75$  and  $19.75 \pm 1.00$  and  $283.5 \pm 18.00$  and  $20, 75 \pm 1.50$ , respectively. As for the seminal evaluations, only the moments that were determined with puberty (0, +30 and +60) were counted, with values within these periods for motility (%), concentration ( $\times 10^6$ ) and major defects (%) and minors (%) of semen of  $11.25 \pm 1.8$ ,  $167.5 \pm 20$ ,  $43.65 \pm 5.2$  and  $4.65 \pm 0.9$ ;  $51.85 \pm 0.9$ ,  $270 \pm 14.2$ ,  $20.35 \pm 4.7$  and  $8.12 \pm 134.44$ ;  $67.5 \pm 6.9$ ,  $398.75 \pm 24.6$ ,  $7.87 \pm 1.6$  and  $13.75 \pm 3.1$ , respectively. Serum concentrations (pmol/L) of AMH were determined by ELISA kit (AL-114/AnshLabs®). The mean values for AMH within the periods of -60, -30, 0, +30 and +60 were  $611.35 \pm 200.02$ ,  $554.94 \pm 393.16$ ,  $621.61 \pm 285.15$ ,  $370, 36 \pm 134.44$  and  $51.65 \pm 17.80$ , respectively. It was observed that AMH concentrations declined from puberty onwards, with significance ( $p < 0.05$ ) 60 days after the onset of puberty, with no correlation with the andrological variables analyzed. In this way, it is not a good tool for early prediction of puberty in Nelore bulls.

**Keywords:** AMH; *Bos indicus*; Puberty; young bulls.

## Perspectiva econômica da utilização de touros Nelore superprecoces em rebanhos de genética

Adriana Aparecida Lima<sup>1,3</sup>, André Luiz Julien Ferraz<sup>2</sup>, André Rozemberg Peixoto Simões<sup>2</sup>, Fabiana Andrade Melo Sterza<sup>2</sup>, Luiz Carlos Cesar da Costa-Filho<sup>3</sup>, Fernanda Battistotti Barbosa<sup>3</sup>, Neimar Correa Severo<sup>4</sup>, Solange Martins Almeida<sup>4</sup>, Gustavo Guerino Macedo<sup>5</sup>, Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEMS, Aquidauana, MS, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Aquidauana/MS; <sup>3</sup>Médicos Veterinários - Procriar; <sup>4</sup>Alta Genetics; <sup>5</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande/MS, Grupo de estudos e pesquisas em Reprodução Animal - GERA-MS/CNPq

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

Os rebanhos de genética Nelore no Brasil têm investido em seleção para precocidade sexual de fêmeas e machos com o intuito de promover a redução do ciclo pecuária eliminando a fase de recria. Vislumbrar a vantagem em fêmeas com a produção de um bezerro é fácil para o produtor, mas o investimento na seleção de tourinhos tem gerado questionamentos quanto a possibilidade de utilização desses animais antes dos dois anos e qual seria a lucratividade para quem investe na seleção em machos superprecoces. O objetivo desse trabalho foi avaliar a perspectiva econômica da adoção da tecnologia de avaliação de precocidade sexual para um rebanho produtor de genética. Os animais (46 touros, Nelore PO) eram oriundos de oito rebanhos diferentes e estavam sob coleta em uma central de coleta e processamento de sêmen (CCPS). Todos passaram pela avaliação de idade à puberdade (IPM), em seus rebanhos de origem, através de ultrassonografia testicular e classificados como: superprecoces (SP), precoces (P) e tradicionais (TD), apresentando IPM média de 12,04, 15,03 e 19,30 meses, respectivamente. Foi desenvolvida uma análise de orçamento parcial, simulando 100 machos desmamados, em uma propriedade com programa de melhoramento genético estabelecido, com sistema de cria, recria e venda de touros PO. Realizou-se quatro simulações, em todas no segundo ano 1 macho foi encaminhado para CCPS e 4 permaneceram na propriedade: (S-TD)- utilizados 5 machos TD; (S-P)- 5 machos P, na primeira estação de monta após a desmama, através de coleta de sêmen a fresco e IATF (ano 1), sendo possível a utilização apenas no final da estação de monta aos 16 -18 meses de idade. (S-SP)- 5 machos SP utilizados na primeira estação de monta após a desmama através de coleta de sêmen a fresco e IATF (ano 1). Todos os animais que permaneceram na propriedade foram utilizados para coleta de sêmen a fresco e monta natural até 36 meses. (S-C) - CONTROLE: considerou-se as mesmas taxas de prenhez e número de machos desmamados (100) e utilizados na propriedade e CCPS. Todos os animais foram vendidos como reprodutores após 36 meses. O número de doses de sêmen congelado produzidas foi real e informadas pela CCPS, apenas calculou-se a produção acumulada de doses /touro de acordo com a média de produção para cada classificação de IPM. Os animais SP e P iniciaram a produção, na CCPS, aos 22 e 21 meses, respectivamente. A média de doses produzidas dos SP foi 28,32% maior aos 26 meses e 73,69% aos 36 meses, em relação aos P (7247 vs 5247 doses e 31294 vs 18017, respectivamente). Os animais TD produziram 84,54% menos doses, aos 36 meses, do que os SP. O orçamento parcial inclui apenas recursos que serão alterados avaliando sua capacidade de aumentar ou diminuir a receita. Após o levantamento definiu-se os valores em seções subdivididos em seção 1 (custos): os custos adicionados somados a renda reduzida e seção 2 (benefícios): a receita adicionada somada aos custos reduzidos. Calculou-se o Lucro líquido = (RA + CR) – (CA + RR), em que: RA é a receita adicional, CR os custos reduzidos, CA os custos adicionados e RR as receitas reduzidas. A relação benefício/custo determina qual alternativa será mais lucrativa quando comparadas entre dois orçamentos parciais com o mesmo lucro líquido e permite saber quanto cada R\$ 1,00 investido trará de retorno. Comparou-se a diferença da relação benefício custo das três simulações com o controle. A seção 1 incluiu: Custos adicionados devido à mudança: custo da avaliação da IPM (100 machos) - R\$ 6.000,00 para as simulações, controle = R\$0,00; Estadia na quarentena na CCPS; Exames sanitários na CCPS; Estadia em produção na CCPS; Custo das doses envasadas; Coleta na propriedade (ano 1 e 2); Custo de produção de 4 animais entre 24 e 36 meses de idade. Renda reduzida devido à mudança levou em consideração: a venda dos 5 machos aos 24 meses; Subtotal dos custos; R\$ 223.157,18 (T); R\$ 232.787,18(P); R\$ 291.973,68 (SP); R\$ 210.123,80 (C). Seção 2: Benefícios - Receitas adicionadas com a mudança: Receita do touro em coleta na CCPS; Progênie IATF – Ano 1 (apenas para P e SP); Progênie IATF e do repasse no Ano 2; Venda dos 4 touros aos 36 meses. Custos reduzidos devido à mudança: Compra de doses de sêmen - Ano 1 (apenas para P e SP) e Ano 2; Uso dos 4 touros no repasse - Ano 2. Subtotal dos benefícios: R\$ 1.357.613,20 (T); R\$ 1.496.794,20 (P); R\$ 2.231.785,50 (SP); R\$ 1.299.625,90 (C). Lucro líquido: R\$ 1.134.456,02; R\$ 1.264.007,02; R\$ 1.939.811,82; R\$ 1.089.502,22. Benefício/custo: R\$ 6,08; R\$ 6,43; R\$ 7,64; R\$ 6,19. Diferença da relação benefício/ custo para o controle: - R\$ 0,11 (TD); R\$ 0,24 (PM); R\$ 1,45(EM). As três simulações obtiveram lucro líquido positivo e superiores ao controle indicando que a adoção da tecnologia e uso dos reprodutores é viável. A tecnologia de avaliação de precocidade sexual de machos Nelore se mostrou lucrativa e com relação benefício/custo atrativa nas simulações propostas. A possibilidade de uso dos animais SP anterior à sua comercialização beneficia o produtor financeira e geneticamente e ainda contribui com a análise prévia do “fator touro”, sendo possível as CCPS contratarem animais de melhores índices na IATF contribuindo com o aumento da taxa de prenhez dos rebanhos.

**Palavras-chave:** melhoramento genético, orçamento parcial, puberdade, touros jovens.

**Agradecimentos:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

## Economic perspective for using early maturing Nelore bulls in genetic herds

Adriana Aparecida Lima<sup>1,3</sup>, André Luiz Julien Ferraz<sup>2</sup>, André Rozemberg Peixoto Simões<sup>2</sup>, Fabiana Andrade Melo Sterza<sup>2</sup>, Luiz Carlos Cesar da Costa-Filho<sup>3</sup>, Fernanda Battistotti Barbosa<sup>3</sup>, Neimar Correa Severo<sup>4</sup>, Solange Martins Almeida<sup>4</sup>, Gustavo Guerino Macedo<sup>5</sup>, Eliane Vianna da Costa-e-Silva<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UEMS, Aquidauana, MS, Brasil; <sup>2</sup>Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul – Aquidauana/MS; <sup>3</sup>Médicos Veterinários Procriar; <sup>4</sup>Alta Genetics; <sup>5</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campo Grande/MS, Grupo de estudos e pesquisas em Reprodução Animal - GERA-MS/CNPq  
\*E-mail: eliane.silva@ufms.br

The Nelore genetics herds in Brazil have invested in selection for sexual precocity of females and males in order to promote the reduction of the livestock cycle by eliminating the rearing phase. Seeing the advantage in females with the production of a calf is easy for the producer, but the investment in the selection of young bulls has raised questions about the possibility of using these animals before the age of two and what would be the profitability for those who invest in the selection of males early maturing. This study aimed to evaluate the economic perspective of sexual precocity evaluation of Nelore males. Bulls (n = 46) from eight different herds and they had semen collection at a processing center (SCPC). All animals were evaluated for age at puberty (IPM) in their herds of origin, by testicular ultrasound and classified as: early maturing (EM), precocious maturing (PM) and traditional maturing (TD), with an average MPI of 12.04, 15.03 and 19.30 months, respectively. A partial budget analysis was developed, simulating 100 weaned males, in a property with an established genetic improvement program, with a system of breeding, rearing, and selling PO bulls. Four simulations were carried out, in all of them in the second year 1 male was sent to SCPC and 4 remained on the property: (S -TD)- 5 TD males were used; (S- PM)- 5 PM males, in the first breeding season after weaning, through fresh semen collection and FTAI (year 1), being possible to use only at the end of the breeding season at 16 -18 months of age. (S-EM)- 5 EM males used in the first breeding season after weaning through fresh semen collection and FTAI (year 1). All animals that remained on the property were used for fresh semen collection and natural mating up to 36 months. (S-C) – CONTROL: the same pregnancy rates and number of males weaned (100) and used on the property and SCPC were considered. All the animals were sold as breeders after 36 months. The number of semen doses produced/bull was real and It reported by SCPC and we calculated the total of doses produced based in media production of bulls / IPM classification. The EM and PM animals started production, in SCPC, at 22 and 21 months, respectively. The average doses produced by EM were 28.32% higher at 26 months and 73.69% at 36 months, compared to PM (7247 vs 5247 doses and 31294 vs 18017, respectively). TD animals produced 84.54% less doses at 36 months than EM. The partial budget only includes resources that will change based on their ability to increase or decrease revenue. After the survey, the values were defined in sections subdivided into section 1 (costs): added costs plus reduced income, and section 2 (benefits): added revenue plus reduced costs. Net income = (AR + RC) – (AC + RR) was calculated, where: AR is the additional revenue, RC the reduced costs, AC the added costs and RR the reduced revenues. The benefit/cost ratio determines which alternative will be more profitable when comparing two partial budgets with the same net income and allows you to know how much each BRL 1.00 invested will bring in return. The relationship is obtained by dividing the total benefits by the total costs, as the following formula: Benefit/cost = (AR + RC) / (AC + RR). The difference in the cost-benefit ratio of the three simulations was compared with the control. All values were expressed in BRL. The section 1 included: Added costs due to the change: cost of the IPM evaluation (100 males) - 6,000.00 for the simulations, control = 0.00; Quarantine stays, Health examinations and stay in production at SCPC; Cost of bottled doses; Collection in the farm from the Year 1 and 2; Production cost of 4 animals between 24 and 36 months of age. The reduced income due to change: sale of 5 males at 24 months. Subtotal of costs; 223,157.18 (TD); 232,787.18 (PM); 291,973.68 (EM); 210,123.80 (C). Section 2: Benefits - Income added with change: Bull income in SCPC collection; FTAI progeny at 2 years; Transfer progeny – Year 2; Sale of 4 bulls at 36 months. Reduced costs due to moving: Purchase of semen doses - Year 1 (only P and EM bulls) and Year 2; Use of the 4 bulls in the transfer - Year 2. Subtotal of benefits: 1,357,613.20 (TD); 1,496,794.20 (PM); 2,231,785.50 (EM); 1,299,625.90. Net profit: 1,134,456.02; 1,264,007.02; 1,939,811.82; 1,089,502.22 and Benefit/cost: 6.08; 6.43; 7.64; 6.19 to TD, PM, EM and (C) bulls, respectively. Difference in the benefit/cost ratio for the control; -0.11; 0.24; 1.45. The three simulations obtained positive net income and superior to the control, indicating that the adoption of the technology and use of the reproducers is viable. The technology for assessing sexual precocity of Nelore males proved to be profitable and with an attractive benefit/cost ratio in the proposed simulations. The possibility of using EM animals prior to their commercialization benefits the producer financially and genetically and contributes to the prior analysis of the “bull factor”, making it possible for the CCPS to hire animals with better rates in the FTAI, contributing to the increasing in the pregnancy rate of the animals.

**Keywords:** genetic improvement, partial budget, puberty, young bulls.

**Acknowledgements:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”

## Reavaliação da segurança do tratamento com diflubenzuron em touros usando CASA

Marcelo da Cunha Xavier<sup>1\*</sup>, Rodrigo Martins de Moura<sup>2</sup>, Leticia Prates Martins<sup>2</sup>, Claudio Rodrigues Perilo Souza<sup>3</sup>, Maurício Antônio Silva Peixer<sup>1</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, 71735-505 Brazil, <sup>2</sup> Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900 Brazil, <sup>3</sup> Champion Farmacoquímica LTDA, Anápolis, GO, Brazil <sup>4</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 70770-901 Brazil

\*E-mail: marcelo@biotecnologiaanimal.com.br

O diflubenzuron (1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil)ureia, DFB) tem sido utilizado nas últimas décadas para o controle de pragas, tanto em áreas urbanas quanto na agricultura. O DFB é geralmente considerado seguro para uso em animais de produção, no entanto, estudos toxicológicos em outras espécies, particularmente em roedores, permanecem controversos. A segurança do DFB em touros foi avaliada apenas em poucos estudos no final da década de 1970, que não encontraram efeitos prejudiciais do DFB na produção ou qualidade do sêmen. Contudo, o recente desenvolvimento de técnicas analíticas mais sensíveis para avaliação espermática, como a análise de sêmen auxiliada por computador (CASA), abre a oportunidade de se reavaliar a segurança da DFB em touros. Objetivou-se nesse estudo avaliar potenciais efeitos negativos do DFB na produção e qualidade do sêmen. Touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*, n=14) foram alocados aleatoriamente nos grupos controle (GC, n=7) ou tratamento (DFB, n=7). Os touros foram mantidos a pasto e receberam 100g/cabeça/dia de suplemento mineral contendo 1,2g de diflubenzuron 3% (Difly, Champion, Brasil) (DFB) ou não (GC). A cada duas semanas, os touros foram pesados e submetidos à coleta de sêmen e sangue, este último utilizado para análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos. O sêmen foi submetido à avaliação física e morfológica, e amostras foram diluídas (Optixcell, IMV) e armazenadas para posterior análise. O CASA (Sperm Vision, Minitube) foi utilizado em amostras frescas ou congeladas e descongeladas, submetidas ou não ao teste de termoresistência (TRT) durante 4 h. Os parâmetros cinéticos incluíram motilidade (MOT, %), distância curvilínea (DCL,  $\mu\text{m}$ ), distância média do trajeto (DAP,  $\mu\text{m}$ ), distância em linha reta (DSL,  $\mu\text{m}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média do trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), coeficiente de oscilação (WOB, %), frequência cruzada de batimento (BCF, Hz) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ). Os dados foram analisados considerando os efeitos do tratamento, tempo e interação tratamento x tempo, utilizando-se o Proc Glimmix do SAS. Não houve efeito do tratamento com DFB no peso corporal médio (P=0,9831), hematócrito (P=0,2156), proteína plasmática (P=0,1487), fosfatase alcalina (P=0,7244) ou creatinina (P=0,3294). Em ambos os grupos, todos os parâmetros sanguíneos permaneceram dentro da faixa de variação fisiológica durante todo o período experimental. O tratamento com DFB não teve efeito no volume (P=0,0634), motilidade (P=0,4239), vigor (P=0,4205), turbilhonamento (P=0,6363), ou nos defeitos maiores (P=0,0569) e menores (P=0,2866). Também não houve efeito do tratamento em nenhum parâmetro do CASA (P>0,05). Como esperado, efeito do tempo foi observado em vários parâmetros, no entanto, interações tempo x tratamento ocorreram apenas para DSL no sêmen fresco (GC 23,1 $\pm$ 0,4 e DIB 24,5 $\pm$ 0,9, P=0,0407) e para MOT (GC 28,3 $\pm$ 2,9 e DIB 27,8 $\pm$ 2,7, P=0,0132), DSL (GC 22,5 $\pm$ 0,6 e DFB 24,3 $\pm$ 0,9, P=0,0281), VSL (GC 50,9 $\pm$ 1,3 e DFB 55,7 $\pm$ 1,7, P=0,0104) e ALH (GC 5,4 $\pm$ 0,1 e DFB 5,5 $\pm$ 0,1, P=0,0077) em amostras congeladas. Em conclusão, a administração oral de diflubenzuron, dentro da dose recomendada, não tem efeitos negativos a curto prazo na produção ou qualidade do sêmen bovino.

**Palavras-chave:** Difly, disruptores reprodutivos, qualidade espermática, bovinos

## Reassessing the safety of diflubenzuron treatment in sires using CASA

Marcelo da Cunha Xavier<sup>1\*</sup>, Rodrigo Martins de Moura<sup>2</sup>, Leticia Prates Martins<sup>2</sup>, Claudio Rodrigues Perilo Souza<sup>3</sup>, Maurício Antônio Silva Peixer<sup>1</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, 71735-505 Brazil, <sup>2</sup> Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900 Brazil, <sup>3</sup> Champion Farmacoquímica LTDA, Anápolis, GO, Brazil <sup>4</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, 70770-901 Brazil

\*E-mail: marcelo@biotecnologiaanimal.com.br

The diflubenzuron (1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluoro- benzoyl) urea, DFB) has been used over the past decades for pest control both in urban areas and in agriculture. DFB is generally considered as safe for use in livestock, however, toxicological studies on nontarget species such as rodents remain controversial. The safety of DFB in male cattle was addressed only in a few studies in the late 1970's, which found no detrimental effects of DFB on sperm production or quality. The recent development of more sensitive analytic techniques for sperm evaluation, such as computer-assisted sperm analysis (CASA), brings the opportunity to reassess the safety of DFB in bulls. The aim of this study was to evaluate potential detrimental effects of DFB on sperm production and quality. Sound Nelore (*Bos taurus indicus*) bulls (n=14) were randomly allocated into a control (CG, n=7) or treatment (DFB, n=7) group. The bulls were kept under pasture and received 100g/head/day of a mineral mix supplement containing 1.2 g diflubenzuron 3% (Difly, Champion, Brazil) (DFB) or not (CG). Every other week, bulls were weighed and subjected to semen and blood sample collection, the latter used for analysis of hematological and biochemical endpoints. The sperm underwent physical and morphological evaluation, and samples were diluted (Optixcell, IMV) and stored for further analysis. CASA (Sperm Vision, Minitube) was performed in fresh or frozen samples immediately after thawing or after being submitted to a thermo-resistance test (TRT) during 4 h. Kinetic endpoints included motility (MOT, %), curvilinear distance (DCL,  $\mu\text{m}$ ), distance of average path (DAP,  $\mu\text{m}$ ), straight line distance (DSL,  $\mu\text{m}$ ), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), average path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), continuous line velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), linearity (LIN, %), straightness (STR, %), Wobble coefficient (WOB, %), beat cross frequency (BCF, Hz), and amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ). Data were analyzed considering the effects of treatment, time, and their interaction, using the Proc Glimmix of the SAS. There was no effect of DFB treatment on average body weight (P=0.9831), hematocrit (P=0.2156), or in plasma protein (P=0.1487), alkaline phosphatase (P=0.7244), or creatinine (P=0.3294). In both groups, all blood endpoints remained within the physiological range throughout the experimental period. DFB treatment had no effect on volume (P=0.0634), motility (P=0.4239), vigor (P=0.4205), mass movement (P=0.6363), or in major (P=0.0569) and minor defects (P=0.2866). There was also no treatment effect on any CASA endpoint (P>0.05). As expected, time-effects were observed on a number of parameters, however, time x treatment interactions occurred only for DSL in fresh (CG 23.1 $\pm$ 0.4 e DIB 24.5 $\pm$ 0.9, P=0.0407) and for MOT (CG 28.3 $\pm$ 2.9 e DIB 27.8 $\pm$ 2.7, P=0.0132), DSL (CG 22.5 $\pm$ 0.6 e DFB 24.3 $\pm$ 0.9, P=0.0281), VSL (CG 50.9 $\pm$ 1.3 e DFB 55.7 $\pm$ 1.7, P=0.0104) and ALH (CG 5.4 $\pm$ 0.1 e DFB 5.5 $\pm$ 0.1, P=0.0077) in frozen samples. In conclusion, the oral administration of diflubenzuron, within the recommended dose, has no short-term negative effects on sperm production or quality in cattle.

**Keywords:** Difly, reproductive disruptors, sperm quality, cattle



## Suplementação do sêmen bovino descongelado com pentoxifilina: avaliação da fertilidade em fêmeas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo

Daniel Nobre Maia<sup>1\*</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>3</sup>, Anna Carolina Pecini da Silva<sup>1</sup>, Marianne de Souza Santos<sup>1</sup>, Walter Augusto dos Santos Marinho<sup>4</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Graduando Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup> Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT;

<sup>4</sup>Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT), São Vicente, MT; <sup>5</sup>Gestor Técnico, Rico Nutrição Animal Ltda.

\*E-mail: danielnobremaia@hotmail.com

O sucesso da concepção depende do encontro síncrono entre os gametas masculino e feminino. O desenvolvimento de estratégias potencializadoras dos fatores intrínsecos aos espermatozoides é de grande importância para otimização de biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A pentoxifilina (PTX) é uma metilxantina com ação promotora de características cinéticas e metabólicas das células espermáticas através da inibição não seletiva de fosfodiesterases e aumento intracelular de nucleotídeos cíclicos, como adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC). O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da adição de PTX ao sêmen bovino descongelado sobre sua fertilidade em protocolo IATF. Vinte e duas fêmeas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) foram submetidas a protocolo de IATF iniciado no Dia -10 com a aplicação intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (BE) + 0,5 mg de cloprostenol sódico (PGF) e inserção de dispositivo intravaginal de liberação controlada de progesterona (1,0 g). Este, por sua vez, foi retirado no Dia -2 juntamente com a administração intramuscular de 1 mg de cipionato de estradiol (CE) + 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) + 0,5 mg de PGF. No Dia 0 foi administrado 25 µg de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e realizada a IATF. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: G0 - sêmen com 0 mM de PTX (n=11) e G7,2 - sêmen com 7,2 mM de PTX (n=11). O diagnóstico de gestação foi realizado no Dia 30 por meio de ultrassonografia em modo B com auxílio de probe transretal de 7,5 MHz. A taxa de concepção (D 30) foi utilizada como parâmetro de fertilidade entre os grupos experimentais, sendo as vacas classificadas como prenhes e não prenhes. A análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Não houve diferença significativa entre as taxas de concepção dos grupos experimentais (45,5% para ambos os grupos). Sendo assim, conclui-se que o uso de pentoxifilina não alterou as taxas de concepção de fêmeas bovinas após a IATF. Entretanto, faz-se necessário a realização de novos estudos utilizando tanto um maior número de indivíduos, quanto diferentes concentrações suplementares de inibidores de fosfodiesterases no sêmen bovino descongelado no momento da IATF.

**Palavras-chave:** Promotor metabólico, espermatozoide, taxa de prenhez.

## Supplementation of thawed bovine semen with pentoxifylline: evaluation of fertility in Nelore females submitted to fixed-time artificial insemination

Daniel Nobre Maia<sup>1\*</sup>, Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis<sup>2</sup>, Tathiana Ferguson Motheo<sup>3</sup>, Anna Carolina Pecini da Silva<sup>1</sup>, Marianne de Souza Santos<sup>1</sup>, Walter Augusto dos Santos Marinho<sup>4</sup>, Pedro Paulo Tsuneda<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Graduating de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, MT, Brasil; <sup>3</sup>Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT;

<sup>4</sup>Instituto Federal de Mato Grosso (IFMT), São Vicente, MT; <sup>5</sup>Gestor Técnico, Rico Nutrição Animal Ltda

\*E-mail: danielnobremaia@hotmail.com

Conception success depends on the synchronous encounter between male and female gametes. The development of strategies to enhance sperm intrinsic factors is primordial to optimize reproductive biotechnologies, such as fixed-time artificial insemination (FTAI). Pentoxifylline (PTX) is a methylxanthine that promotes sperm cells kinetic and metabolic characteristics through non-selective inhibition of phosphodiesterases and intracellular increase in cyclic nucleotides, such as adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP). The present study aimed to evaluate the effects of the addition of PTX in post-thawed bovine semen on the conception rates of cows after an FTAI protocol. Twenty-two Nelore cows (*Bos taurus indicus*) were submitted to an FTAI protocol. On Day -10, cows received 2 mg of estradiol benzoate (EB) + 0.5 mg of sodium cloprostenol (PGF) intramuscularly (IM) and insertion of controlled-release progesterone intravaginal device (1.0 g). On Day -2 the device was withdrawn and 1 mg of estradiol cypionate (EC) + 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) + 0.5 mg of PGF were injected intramuscularly. On Day 0, 25 µg of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), IM, was administered and FTAI was performed. The animals were randomly divided into two groups: G0 - semen with 0 mM PTX (n=11) and G7,2 - semen with 7.2 mM PTX (n=11). Pregnancy was confirmed on Day 30 using a B-mode ultrasound with the aid of a 7.5 MHz transrectal probe. Conception rate (D 30) was used as a fertility parameter among the experimental groups and cows were rated as pregnant and non-pregnant. Statistical analysis was performed by Fisher's exact test, with significance level set at 5%. There was no significant difference on the conception rates among the experimental groups (45.5% on both groups). In conclusion, the use of pentoxifylline did not change the conception rates of cows after FTAI. However, further studies using a greater number of individuals and different supplementary concentrations of phosphodiesterase inhibitors in bovine post-thawed semen at the time of FTAI should be performed.

**Keywords:** Metabolic promoter, sperm, pregnancy rate.

## Temperamento animal pode influenciar o desenvolvimento reprodutivo de machos bovinos?

Mariana Karla Francolino da Silva<sup>1</sup>, Marcelo Sant'Anna Borges<sup>2</sup>, Richardt Gama Landgraf<sup>3</sup>, Marcelo Francisco Arantes Pereira<sup>4</sup>, André Maciel Crespilho<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Santo Amaro – UNISA, São Paulo, SP, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, Sertãozinho, SP;

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil; <sup>4</sup>Instituto de Zootecnia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil; <sup>5</sup>Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil

\*E-mail: marianakarlaf@gmail.com

A eficiência reprodutiva e ganho de peso representam as características mais importantes dentro dos sistemas de exploração pecuária. Estudos anteriores constataram que situações estressantes relacionadas ao manejo animal podem induzir alterações comportamentais e elevação dos níveis plasmáticos de cortisol, influenciando negativamente a produção dos hormônios esteroides, com consequente prejuízo à capacidade reprodutiva. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do temperamento animal sobre o desenvolvimento reprodutivo de machos bovinos, testando-se a hipótese de que animais reativos apresentam atraso no desenvolvimento sexual e menor desempenho reprodutivo. Para o estudo foram selecionados 40 garrotes mestiços (Nelore x Santa Gertrudis) com idade média de 12 meses, submetidos a análises comportamentais (etograma e velocidade de fuga do tronco de contenção) para classificação em calmos (AC; n=19), intermediários (IN; n=8) e reativos (AR; n=13). Todos os animais foram submetidos a pesagem em balança digital para acompanhamento do ganho de peso. Coletas de sêmen por eletroejaculação (Neovet® Autojac V3, Uberaba, Brasil) foram conduzidas inicialmente para determinação de puberdade dos animais de cada grupo aos 12 meses de idade (motilidade total mínima  $\geq 10\%$  e concentração espermática  $\geq 10 \times 10^6/\text{ml}$ ), sendo repetidas bimestralmente até o 20º mês de vida. A partir de cada ejaculado foram conduzidas análises de morfologia (contraste de fase), motilidade e concentração espermática (iSperm® Aidmics Biotechnology, Taipei, Taiwan). A partir das mesmas amostras de sêmen recuperadas aos 18 e 20 meses, além de um ejaculado adicional colhido de cada animal aos 22 meses de vida, foi conduzido teste de resistência a criopreservação. Para esse teste todas as amostras foram diluídas (BotuBov® Botupharma, Botucatu, Brasil) e refrigeradas em sistema passivo (Botutainer® Botupharma, Botucatu, Brasil) até a temperatura de 5°C (curva de refrigeração de 5 horas) para posterior criopreservação em vapor de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) em caixa de poliestireno de 45 litros (20 minutos a distância de 3cm do nível do N<sub>2</sub>) para as avaliações quanto aos parâmetros cinéticos (CASA) e integridade de membrana plasmática (combinação de sondas fluorescentes iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína em microscopia de fluorescência) pós-descongelamento. Amostras de sangue venoso foram obtidas para dosagem de cortisol e testosterona (Milliplex® Multi-Species Panel, Merck, Darmstadt, Alemanha). Ultrassonografias testiculares (Sonoscape E2V5 Vet®, Medical Corp, China) foram conduzidas para avaliação do desenvolvimento gonadal a partir da análise de ecogenicidade do parênquima testicular (ImageJ® versão 1.0.8). Todos os animais foram avaliados a cada 60 dias até os 20 meses de idade (n=5 rotinas experimentais) para todas as variáveis de desempenho produtivo e reprodutivo. Os dados gerados foram submetidos a análise de variância com medidas repetidas, utilizando modelos mistos através do comando PROC-MIXED (SAS®). Garrotes classificados como AR apresentaram maior concentração plasmática de cortisol em relação aos classificados como AC (42,01 ng/ml e 8,59 ng/ml, respectivamente; P=0,05). Maior precocidade sexual (caracterizada pelo início da produção de sêmen aos 12 meses de vida; P=0,05) foi observada para os animais IN (25%) quando comparados aos AR (15,38%) e AC (0%). Tendência para maior produção média de testosterona (período entre 12 e 16 meses) foi observada para garrotes AC e IN (12,99 ng/ml e 12,68 ng/ml, respectivamente; P=0,06) em relação aos AR (7,94 ng/ml). No entanto, não foram observadas diferenças (P>0,05) para a produção de testosterona aos 22 meses quando comparados os diferentes grupos experimentais. Animais calmos apresentaram tendência para maior peso corporal médio (316,90 kg; P=0,06) e ganho de peso médio diário (0,39 kg/dia; P=0,07) em comparação aos AR (298,26 kg e 0,33 kg/dia, respectivamente). Não foram observadas diferenças para a qualidade do sêmen *in natura* e pós-descongelamento, circunferência escrotal e ecogenicidade testicular quando comparados os diferentes grupos, independente da rotina experimental. Dessa forma, conclui-se que a maior reatividade animal, expressa por elevações nas concentrações de cortisol, pode influenciar a produção de testosterona de garrotes dos 12 aos 16 meses de vida. Porém, o temperamento não influencia a puberdade e início da produção de sêmen de machos bovinos avaliados a partir dos 12 meses de idade. Maior desenvolvimento corpóreo foi associado a animais de temperamento mais dócil. No entanto, as principais variáveis relacionadas a capacidade reprodutiva, tais como motilidade, vigor, morfologia, concentração espermática, circunferência e ecotextura testicular não sofrem influência do grau de reatividade animal, rejeitando-se a hipótese inicial do estudo.

**Palavras-chave:** sêmen, cortisol, temperamento.

## Can animal temperament influence the reproductive development of male cattle?

Mariana Karla Francolino da Silva<sup>1</sup>, Marcelo Sant'Ana Borges<sup>2</sup>, Richardt Gama Landgraf<sup>3</sup>, Marcelo Francisco Arantes Pereira<sup>4</sup>, André Maciel Crespilho<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Santo Amaro – UNISA, São Paulo, SP, Brasil; <sup>2</sup>Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, Sertãozinho, SP;

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de São Paulo, Diadema, SP, Brasil; <sup>4</sup>Instituto de Zootecnia de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP, Brasil; <sup>5</sup>Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil.

\*E-mail: marianakarlafas@gmail.com

Reproductive efficiency and weight gain are the most important characteristics in livestock farming systems. Previous studies have found that stressful situations related to the daily handling of animals can induce behavioral changes and elevation of plasma cortisol levels, influencing the production of steroid hormones, with consequent reduction on reproductive efficiency in bulls. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of animal temperament on reproductive development of male cattle, testing the hypothesis that reactive animals have delayed in sexual development and lower reproductive performance. For the study, 40 crossbred young bulls (Nelore x Santa Gertrudis) were selected, with an average age of 12 months, submitted to behavioral analysis (ethogram and exit velocity from the containment trunk) to classify in calm (AC; n=19), intermediate (IN; n=8) and reactive (AR; n=13). All animals were weighed using digital scale to monitor weight gain. Semen collections by electroejaculation (Neovet® Autojac V3, Uberaba, Brazil) were performed to evaluate the initial semen production (puberty) in each group (minimum total motility  $\geq 10\%$  and sperm concentration  $\geq 10 \times 10^6/\text{ml}$ ), followed by seminal quality analysis (motility and sperm concentration [iSperm® Aidmics Biotechnology, Taipei, Taiwan], vigor and morphology). Semen samples harvest from animals with age of 18, 20 and 22 months were diluted (BotuBov® Botupharma, Botucatu, Brasil) and cooled in a passive system (Botutainer® Botupharma, Botucatu, Brazil) to 5°C (5-hour cooling curve) for subsequent cryopreservation in liquid nitrogen vapor (N<sub>2</sub>) in a polystyrene box (20 minutes at 3 cm from the N<sub>2</sub> level) for post-thawing evaluations of kinetic parameters (CASA) and plasma membrane integrity (fluorescent microscopy using PI and carboxylfluorescein diacetate). Blood samples were collected for cortisol and testosterone measurements (Milliplex® Multi-Species Panel, Merck, Darmstadt, Germany). Testicular ultrasonography (Sonoscape E2V5 Vet®, Medical Corp, China) were conducted to assess gonadal development by analyzing the echogenicity of the testicular parenchyma (ImageJ® version 1.0.8). All animals were evaluated every 60 days until they reached 20 months (n=5 experimental routines) for all the productive and reproductive parameters. The data were submitted repeated measures of variance analysis using mixed model procedure (PROC-MIXED SAS®). Animals classified as AR had higher plasma cortisol concentrations compared to those classified as AC (42.01 ng/ml and 8.59 ng/ml, respectively; P=0.05). Greater sexual precocity (characterized by the beginning of semen production at 12 months; P=0.05) was observed for IN animals (25%), when compared to AR (15.38%) and AC (0%). A tendency for higher average testosterone production (period between 12 and 16 months) was observed for AC and IN animals (12.99 ng/ml and 12.68 ng/ml, respectively; P=0.06). However, no differences (P>0.05) were observed for testosterone production at 22 months when the different experimental groups were compared. Calm animals tended to a higher average body weight (316.90 kg; P=0.06) and average daily weight gain (0.39 kg/day; P=0.07) compared to AR (298.26 kg and 0.33 kg/day, respectively). No differences were observed for *in natura* or frozen-thawed semen, scrotal circumference and testicular echogenicity when comparing the different groups, regardless of the experimental routine. It is concluded that greater animal reactivity expressed by elevations in cortisol concentrations can influence bovine testosterone production from 12 to 16 months age. Although, temperament does not influence the beginning of semen production in bovines after 12 months of age. Greater body development was associated to animals with a more docile temperament. However, the main variables related to reproductive capacity, such as motility, vigor, morphology and sperm concentration, testicular circumference and echotexture, are not influenced by the degree of animal reactivity, rejecting the initial hypothesis of the study.

**Keywords:** semen, cortisol, temperament.

## Touros Nelore de alta e baixa fertilidade apresentam plasma seminal com distintos perfis metabômicos

Guilherme Felipe Ferreira dos Santos<sup>1\*</sup>, Manuel Francisco Sá Filho<sup>2</sup>, Edson Guimarães Lo Turco<sup>3</sup>, Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade de São Paulo (USP), São Paulo/SP, Brasil; <sup>2</sup>Alta Genetics, Uberaba/MG, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo/SP, Brasil.

\*E-mail: guilhermefs@usp.br

A seleção de touros superiores geneticamente e com elevada fertilidade são de grande importância para aumentar a eficiência produtiva dos rebanhos. Dessa forma, o entendimento dos processos metabômicos envolvidos na fertilidade é de fundamental importância. Foram coletadas amostras seminais de oito touros Nelore previamente classificados de acordo com fertilidade em programas de inseminação artificial. Os dados de fertilidade foram obtidos de 4.002 IATF realizadas em 37 rebanhos (Programa Conceptplus®). Os touros foram classificados como de alta fertilidade (HF; 56,2±1,85% P/AI) ou de baixa fertilidade (LF; 47,0±1,98% P/AI). Logo após a coleta de sêmen, as amostras foram centrifugadas por duas vezes a 2.000 rpm por 10 minutos com intuito de separar o plasma seminal (PS). As amostras de PS foram imediatamente congeladas a -20°C para posterior análise em cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GCMS). Foram analisados 138 metabômicos endógenos utilizando o método target, a partir de padrões internos deuterados (PID) que permitiram a identificação e a normalização das áreas dos picos (razão de área) obtidas de cada metabômico em ng/mL. Primeiramente, os dados obtidos de cada metabômico foram compilados para a análise de componentes principais (PCA) e para caracterizar a estrutura dos dados e detectar possíveis outliers. Em seguida, foi realizada a projeção ortogonal para análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para extrair os metabômicos mais importantes (VIP score) na construção do modelo e na separação entre os dois grupos (HF e LF). A análise de vias metabômicas (VM) foi realizada integrando a análise de enriquecimento e topologia das vias. As análises estatísticas foram realizadas usando o sistema em R do MetaboAnalyst 5.0 e o banco de dados KEGG. Com base no VIP score ( $\geq 1,5$ ), foram identificados os seguintes metabômicos em ordem decrescente de importância: uracila, L-metionina sulfoxido, ornitina, adenosina monofosfato, tetradecanoilcarnitina, fosfatidilcolina (PC 38:4), decanoilcarnitina e L-quinurenina, respectivamente. As VM mais relevantes ( $P < 0,05$ ) estão apresentadas em ordem decrescente: biossíntese de pantotenato e CoA, metabolismo da beta-alanina, metabolismo das pirimidinas, metabolismo da glutatona, biossíntese de arginina e metabolismo da tiamina, respectivamente. Em touros LF as vias de biossíntese do pantotenato, da CoA e do metabolismo da beta-alanina, foram representadas por maiores concentrações ( $P < 0,01$ ) de uracila e L-cisteína e menores concentrações de pantotenato. Ainda, em touros LF o metabolismo das pirimidinas foi representado por maior concentração de uracila ( $P < 0,01$ ). Entretanto, em touros HF a ornitina apresentou alta concentração ( $P = 0,006$ ) e foi fortemente relacionada ao metabolismo da glutatona. A biossíntese de arginina também pode ser representada pela ornitina. Conclui-se nesse estudo que existem diferenças metabômicas evidentes no plasma seminal de touros HF e LF.

**Palavras-chave:** Sêmen, metabolismo, biossíntese.

## Nellore sires of high and low fertility show seminal plasma with distinct metabolomic profiles

Guilherme Felipe Ferreira dos Santos<sup>1\*</sup>, Manuel Francisco Sá Filho<sup>2</sup>, Edson Guimarães Lo Turco<sup>3</sup>, Pietro Sampaio Baruselli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of São Paulo - USP, São Paulo, SP, Brazil; <sup>2</sup>Alta Genetics; Uberaba, MG, Brazil <sup>3</sup>Federal University of São Paulo - UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil.

\*E-mail: guilhermefs@usp.br

The selection of genetically superior sires with high fertility is of great importance to improve the productive efficiency of herds. Therefore, the understanding of the metabolic processes involved in fertility is fundamental. Seminal samples were collected from eight Nellore sires previously, classified according to fertility in artificial insemination programs. The fertility data were obtained from 4002 FTAI performed in 37 herds (Concept Plus® program). Sires were classified as high fertility (HF; 56.2±1.85% P/AI) or low fertility (LF; 47.0±1.98% P/AI). Just after semen collection, samples were centrifuged twice for 10 minutes at 2000 rpm in order to separate seminal plasma (SP). SP samples were immediately frozen at -20°C for later analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GCMS). One hundred and thirty-eight endogenous metabolites were analyzed using the target method, which used a deuterated internal standard (DIS) that provided the identification and normalization of peak areas (area ratio) obtained from each metabolite in ng/mL. First, the data obtained from each metabolite were compiled for principal component analysis (PCA) and to characterize the structure of the data and detect possible outliers. Thereafter, orthogonal projection was performed for partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to extract the most important metabolites (VIP score) in the construction of the model and in the separation between the two groups (HF and LF). Metabolic pathway analysis (MPA) was conducted by integrating enrichment analysis and pathway topology. Statistical analyses were performed by means of the MetaboAnalyst 5.0 R-system and the KEGG database. According to the VIP score ( $\geq 1.5$ ), the following metabolites in descending order of importance are presented as follows: uracil, L-methionine sulfoxide, ornithine, adenosine monophosphate, tetradecanoylcarnitine, phosphatidylcholine (PC 38:4), decanoylcarnitine, L-kinurenine, respectively. The most relevant MPA ( $P < 0.05$ ) are presented in descending order as follows: pantothenate and CoA biosynthesis, beta-alanine metabolism, pyrimidine metabolism, glutathione metabolism, arginine biosynthesis and thiamine metabolism, respectively. In LF sires, the pathways of pantothenate biosynthesis, CoA and beta-alanine metabolism, were represented by higher concentrations ( $P < 0.01$ ) of uracil and L-cysteine and lower concentrations of pantothenate. Also, in LF sires the metabolism of pyrimidines was represented by higher concentration of uracil ( $P < 0.01$ ). However, in HF sires ornithine showed high concentration ( $P = 0.006$ ) and was strongly related to glutathione metabolism. Arginine biosynthesis can also be represented by ornithine. Thus, it is possible to conclude that there are evident metabolic differences in the seminal plasma of HF and LF sires.

**Keywords:** Semen, metabolism, biosynthesis.

## Uso de células tronco mesenquimais para o tratamento de degeneração testicular em touro - Relato de Caso

Anna Paula Pascoal Bonfá<sup>1</sup>, Fernanda da Cruz Landim<sup>2</sup>, Beatriz Canabrava Garrido<sup>3</sup>, Gustavo Henrique Batista Lara<sup>3</sup>, Larysse Aparecida Alves<sup>3,4</sup>, Yasmin El Hayek<sup>1,2</sup>, Mariana Karla Francolino Silva<sup>5</sup>, André Maciel Crespillo<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>PUC Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal – FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil. <sup>3</sup>Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil. <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil. <sup>5</sup>Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo, SP, Brasil  
\*E-mail: andre.crespillo@centralbelavista.com.br

A degeneração testicular (DT) representa a maior causa de infertilidade em touros e, embora muitos avanços tenham sido observados no tocante a compreensão da etiopatogenia da doença, até o momento poucas são as opções disponíveis para o tratamento desse quadro. Nesse contexto, as células tronco mesenquimais alogênicas (CTMs) têm sido empregadas em diferentes áreas da Medicina Veterinária para o tratamento de diferentes desordens graças as suas ações de imunomodulação e de estímulo a reparação tecidual. No entanto, poucos são os trabalhos disponíveis na literatura que abordaram o uso das CTMs como estratégia terapêutica para o tratamento da degeneração testicular de touros. O presente relato tem por objetivo apresentar o caso de um reprodutor da raça Tabapuã de 6 anos de idade, 1082 Kg de peso, doador de sêmen manejado em regime de Central de Inseminação Artificial (Central Bela Vista, Botucatu - SP), submetido à terapia celular em função de degeneração bilateral dos testículos. Após cumprir período de quarentena foi iniciado programa de coleta de sêmen (4 saltos por semana) para criopreservação. Após 3 meses de coleta e obtenção de sucessivos ejaculados com baixa qualidade (reduzida motilidade total e progressiva e alto percentual de defeitos espermáticos maiores, sobretudo de cabeça e gotas citoplasmáticas proximais), o animal foi submetido a exame clínico reprodutivo e ultrassonográfico do aparelho reprodutor. No referido exame foi constatado padrão ultrassonográfico heterogêneo do parênquima testicular, com presença de áreas focais de calcificação (pontos hiperecogênicos formadores sombras acústicas) envolvendo ambos os testículos. Frente aos achados ultrassonográficos e do espermograma foi estabelecido o diagnóstico definitivo de degeneração testicular bilateral. Em função do alto valor zootécnico do animal e da irreversibilidade do quadro clínico diagnosticado foi indicado o uso de CTMs alogênicas para o tratamento reprodutivo. Para esse caso foi utilizado protocolo a base de três aplicações intratesticulares (1 ao mês) conduzidas bilateralmente empregando agulhas hipodérmicas 20x5,5mm; em todas as aplicações as agulhas foram introduzidas na região centro-testicular, seguido pela deposição em leque de  $10 \times 10^6$  de CTMs refrigeradas em cada testículo. A partir de modelo de análise de medidas repetidas no tempo (ANOVA, Graphpad Prism 5.0®) foi comparada a presença de alterações ultrassonográficas do parênquima testicular, além das variáveis peso do sêmen (g); concentração (milhões/ml) e motilidade espermática (%); vigor (0-5); defeitos maiores, menores e totais (%) antes e após (considerados os resultados de cada variável durante o tratamento e ao longo do mês subsequente às aplicações de CTMs) o estabelecimento da terapêutica. Não foram observadas diferenças para a ecotextura do parênquima testicular quando comparados os momentos pré e pós terapia celular. No entanto, foi observado aumento de volume ( $6,7 \pm 3,8$ g antes e  $9,9 \pm 4,4$ g pós-tratamento;  $P=0,009$ ) e de concentração do ejaculado ( $515,1 \pm 320,4 \times 10^6$ /mL antes e  $829,9 \pm 428,0 \times 10^6$ /mL pós-tratamento;  $P=0,006$ ), porém sem efeitos significativos sobre a motilidade ( $36,7 \pm 18,0$  e  $33,3 \pm 16,0$ ;  $P=0,3760$ ) e vigor espermático ( $2,3 \pm 0,8$  e  $2,5 \pm 0,67$ ;  $P=0,4469$ ), respectivamente antes e após o início das aplicações de CTMs. Do ponto de vista morfológico, foi observada redução da proporção de gotas citoplasmáticas proximais ( $18,4 \pm 9,3$  e  $10,8 \pm 7,0$ ;  $P=0,0115$ ), porém sem diferenças relacionadas a contagem de defeitos morfológicos maiores ( $P=0,2785$ ), menores ( $P=0,6120$ ) ou totais ( $P=0,5879$ ). A DT envolve alterações da função testicular e epididimária, resultando em falhas no processo de divisão celular e conseqüente diminuição na produção e/ou na qualidade dos espermatozoides. Embora as CTMs não sejam capazes de se diferenciar em células da linhagem espermátogênica, estudos anteriores demonstraram efeitos proliferativos e regenerativos associados a terapia celular, resultados semelhantes aos do presente relato, onde se observou proliferação celular expressa pelo aumento do peso dos ejaculados e da concentração espermática. Adicionalmente, observou-se a redução da proporção de gotas citoplasmáticas proximais, sinalizando também discreta melhora no processo de espermatocitogênese. Concluiu-se que o uso de células tronco mesenquimais, no protocolo proposto, resultou em melhora parcial do quadro de degeneração testicular, porém sem efeitos de curto prazo sobre motilidade e morfologia espermática.

**Palavras-chave:** Bovino. Espermatogênese. Gota Proximal. Terapia Celular.

## Application of mesenchymal stem cells in a bull with testicular degeneration - Case Report

Anna Paula Pascoal Bonfá<sup>1</sup>, Fernanda da Cruz Landim<sup>2</sup>, Beatriz Canabrava Garrido<sup>3</sup>, Gustavo Henrique Batista Lara<sup>3</sup>, Larysse Aparecida Alves<sup>3,4</sup>, Yasmin El Hayek<sup>1,2</sup>, Mariana Karla Francolino Silva<sup>5</sup>, André Maciel Crespilho<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup>PUC Minas, Belo Horizonte, MG, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal – FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil. <sup>3</sup>Central Bela Vista, Botucatu, SP, Brasil. <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – FMVZ-UNESP, Botucatu, SP, Brasil. <sup>5</sup>Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo, SP, Brasil  
\*E-mail: andre.crespilho@centralbelavista.com.br

Testicular degeneration (TD) is the leading cause of infertility in bulls and although many advances have been observed in the therapy of fertility-related conditions, to date, there are few treatment options to reverse this condition. Allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) have been used in veterinary medicine to treat different disorders due to their immunomodulatory and regenerative effect. The literature suggests that such a therapeutic strategy may be interesting for the treatment of TD. Thus, the objective of the present report is to present the case of a 6-year-old Tabapuan bull, weighing 1082 kg, semen donor, submitted to cell therapy due to a bilateral testicular degeneration. The reproductive bull, upon arrival at Bela Vista Central, Botucatu -SP, Brazil, fulfilled the 43 days quarantine period and was initiated in the semen collection program for cryopreservation. After successive ejaculations with low sperm quality (low total and progressive motility and high percentage of sperm defects), the animal was examined and submitted to ultrasonography of the reproductive system. The ultrasound exam revealed a heterogeneous parenchymal with the presence of calcifications (acoustic shadows covering a significant portion of the organ) in both testis. Due to those ultrasonographic features and the poor quality of the semen the diagnosis of bilateral testicular degeneration was established. Faced with the condition, the use of allogeneic MSCs was indicated for treatment. The protocol used was three bilateral applications with a 20x5.5mm hypodermic needle in the central region of the testicular mediastinum, with deposition in a fan of  $10 \times 10^6$  MSCs per testicle at one-month intervals. After the establishment of therapy, analysis of repeated measures over time (ANOVA, Graphpad Prism 5.0®) was used to compare the presence of ultrasound alterations in the testicular parenchyma, the variables semen weight (g), concentration (millions/ml) and sperm motility (%); stamina (0-5); major, minor and total defects (%). The final analysis was performed 30 days after the last application of MSCs. Upon completion of the three applications, there was no difference in the visual macroscopic evaluation of the ultrasonographic images of the testicular parenchyma when comparing the pre- and post-cell therapy times. However, an increase in ejaculate volume ( $6.7 \pm 3.8$ g before and  $9.9 \pm 4.4$ g after treatment:  $P=0.009$ ) and concentration ( $515.1 \pm 320.4 \times 10^6$ /mL before and  $829.9 \pm 428.0 \times 10^6$ /mL after treatment:  $P=0.006$ ) was observed, but without significant effects on sperm motility. From the morphological point of view, a reduction in the proportion of proximal drops was observed ( $P=0.0115$ ), but vigor, motility and the count of major, minor and total morphological defects showed no significant difference ( $p=0.4469$ ;  $p=0.3760$ ;  $p=0.2785$ ;  $p=0.6120$ ;  $p=0.5879$ , respectively). TD involves changes in testicular and epididymal function with atrophy of the seminiferous tubules, resulting in failures in the cell division process and consequent decrease in the production and/or quality of sperm. Although MSCs are not able to differentiate into cells of the spermatogenic lineage, previous studies have demonstrated proliferative and regenerative effects associated with cell therapy. In this case proliferative effect were also observed, with increase in ejaculate weight and sperm concentration. Additionally, a reduction in the proportion of proximal cytoplasmic droplets was observed, also indicating an improvement in the spermatocytogenesis process. Despite this, there was no concrete increase in sperm motility as well as in the concentration of major, minor and total defects. It was concluded that the use of mesenchymal stem cells, in the proposed protocol, resulted in partial improvement of testicular degeneration, but was not able, in the short-term observation, to reverse the changes related to low sperm motility and high concentration of defects.

**Keywords:** Bovine. Cell Therapy. Proximal Droplets. Spermatogenesis



## Uso de sêmen refrigerado de touros Caracu - relato de caso

**Juliana Corrêa Borges Silva<sup>1,2</sup>, Ana Paula Sivieiro Leite<sup>2</sup>, Alessandra Corallo Nicacio<sup>2</sup>, Ériklis Nogueira<sup>1</sup>,  
Márcio Ribeiro Silva<sup>3</sup>, Julia Mascarello<sup>2</sup>, Roberto Augusto de Almeida Torres Junior<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>3</sup>Melhor Animal/ Jaboticabal, SP, Brasil.

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

Para aumentar a taxa de prenhez, o sêmen refrigerado vem sendo utilizado com eficácia, capaz de proteger a estrutura dos espermatozoides das crioinjúrias. Assim, seu uso está aumentando em várias raças após o protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Na fazenda da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS, em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0 do protocolo) todas as 101 vacas Caracu receberam 2 mg de benzoato do estradiol (RIC-BE<sup>®</sup>, Syntex, Argentina) e um dispositivo intravaginal de progesterona (PRIMER<sup>®</sup>, Tecnopec, Brasil). No Dia 8, o dispositivo de progesterona foi removido e administrou-se 150 µg de d-Cloprostenol (Prolise<sup>®</sup>, i.m., ARSA, Argentina), 300 UI de eCG (Folligon 5000<sup>®</sup>, i.m., Intervet, Holanda) e 1 mg de benzoato do estradiol. No Dia 10 foi procedida a IATF, na janela de 44 a 48 horas após a retirada do dispositivo. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia 45 dias após a IATF (DP 2200 VET<sup>®</sup>, Mindray, China). Foram utilizados quatro touros geneticamente superiores, sendo um deles com 14 meses e os demais acima dos dois anos. Os ejaculados foram refrigerados a 5°C, por 24 horas, em palheta fina (DI=30x10<sup>6</sup> espermatozoides) com diluidor Tris-gema de ovo, com 6% de glicerol. Os ejaculados estavam dentro do padrão do CBRA (mínimo de 70% motilidade e 3 de vigor espermático e máximo de 30% de defeitos totais). A análise estatística foi realizada por meio do Glimmix do SAS (SAS/STAT<sup>®</sup> 9.2, SAS Institute Inc., Estados Unidos). A prenhez do lote foi de 51,5% (101/52) e o touro 1 (70,4%, 19/27) diferiu do touro 4 (36%, 9/25) (P<0,05), não diferindo do touro 2 (56%, 14/25) e do touro 3 (41,7%, 10/24) (P>0,05). Não houve diferença significativa dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen dos touros. Concluímos que o uso do sêmen refrigerado foi acima dos 50% esperado como média para a taxa de prenhez na IATF e faz-se uma alternativa relevante, visto que em anos anteriores os índices históricos de prenhez eram no máximo de 40%, além da possibilidade do uso do touro jovem que apresentou 56% de prenhez.

**Palavras-chave** Processamento de sêmen, prenhez, espermatozoide.

## Use of cooled semen Caracu bulls - case report

**Juliana Corrêa Borges Silva<sup>1,2\*</sup>, Ana Paula Sivieiro Leite<sup>2</sup>, Alessandra Corallo Nicacio<sup>2</sup>, Ériklis Nogueira<sup>1</sup>,  
Márcio Ribeiro Silva<sup>3</sup>, Julia Mascarello<sup>2</sup>, Roberto Augusto de Almeida Torres Junior<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; <sup>3</sup>Melhor Animal/ Jaboticabal, SP, Brasil

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

To increase pregnancy rate, chilled semen has been used effectively, capable of protecting the sperm structure from cryoinjuries. So, its use is increasing in many breeds after the use fixed-time artificial insemination protocol (IATF). At Embrapa Gado de Corte farm, Campo Grande - MS, on a random day of the estral cycle (Day 0 of the protocol) all 101 Caracu cows received 2 mg estradiol benzoate (RIC-BE®, Syntex, Argentina) and an intravaginal progesterone device (PRIMER®, Tecnopec, Brazil). On Day 8, progesterone device was removed and administered 150 µg of d-Cloprostenol (Prolise,i®.m., ARSA, Argentina), 300 IU of eCG (Folligon 5000,i®.m., Intervet, Netherlands) and 1 mg of estradiol benzoate. On Day 10, the FTAI was carried out in the window of 44 to 48 hours after the removal of the device. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound 50 days after FTAI (SD 2200 VET®, Mindray, China). Four genetically superior bulls were used, one of them 14 months old, and the others, over two years old. The ejaculates were cooled at 5°C for 24 hours in straws (ID=30x106 spermatozoa) with Tris buffer with 20% yolk and 6% glycerol. The ejaculates were into CBRA standard (minimum 70% motility and 3 vigor and maximum 30% total defects). Statistical analysis was performed using the SAS Glimmix (SAS/STAT® 9.2, SAS Institute Inc., USA). The pregnancy was 51.5% (101/52), and bull 1 (70.4%, 19/27) differed from bull 4 (36%, 9/25) ( $P < 0.05$ ), although did not differ from bull 2 (56%, 14/25) and bull 3 (41.7%, 10/24) ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in the physical and morphological aspects of the semen, among bulls. We conclude that use of cooled semen was above 50% expected as an average for the pregnancy rate in FTAI. This is a relevant alternative, since in previous years the historical pregnancy rate was at a maximum of 40%, in addition to the possibility of using the young bull, with in this case, 56% pregnancy rate.

**Keywords:** spermatozoa, semen process, pregnancy rate.

## Utilização da termografia infravermelha, ultrassonografia em modo B e Doppler como técnicas complementares ao exame andrológico de bovinos

Marcelo Sant'Ana Borges<sup>1\*</sup>, Marina de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>1</sup>, Naiara Nantes Rodrigues<sup>1</sup>, Leticia Padovani da Silva<sup>2</sup>, Jaine Martelo Pagoto<sup>1</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>2</sup>, Fabio Morato Monteiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – FCAV, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>2</sup> IZ – Instituto de Zootecnia, Centro avançado de pesquisa e desenvolvimento de bovinos de corte, Sertãozinho, SP, Brasil

\*E-mail: borges.msa@gmail.com

A utilização de técnicas complementares ao exame andrológico tem aumentado nos últimos anos, principalmente para identificar características com potencial para prever a fertilidade bovina. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial da termografia infravermelha, ultrassonografia em modo B e Doppler como técnicas complementares para identificação de características diferenciais entre touros da raça Nelore com diferentes taxas de prenhez. Para isso, foram utilizados 29 touros com idade entre 2 e 4 anos e peso corporal médio inicial de  $546 \pm 79$  kg. Durante as rotinas foram realizadas avaliações de termografia infravermelha utilizando a câmera termográfica portátil (FLIR T420, FLIR Systems Inc.) e análises de imagens de software apropriado (Research IR® 4) para mensurar a temperatura do polo proximal (TPP, °C) e do polo distal (TPD, °C) do escroto. A partir disto, o gradiente de temperatura (GT, °C) foi calculado pela diferença entre TPP e TPD. As imagens ultrassonográficas foram capturadas utilizando equipamento ultrassonográfico portátil (Mindray Z5®) acoplado a um transdutor linear na frequência de 7,5 MHz. As imagens em modo B foram realizadas no plano longitudinal e transversal dos testículos, já as imagens em modo Doppler foram capturadas no cordão espermático. Posteriormente, foram analisadas utilizando o software Image Pro Plus 7.0TM (Media Cybernetics Inc.) resultando em intensidade de pixel mínima, média e máxima, e heterogeneidade do parênquima testicular. Com as imagens da ultrassonografia doppler foi analisado o diâmetro da artéria testicular (cm), velocidade do pico sistólico (VPS, cm/s), velocidade do pico diastólico (VPD, cm/s), índice de resistibilidade (IR) e índice de pulsatilidade (IP). Os animais participaram da estação de monta natural (EMN) com duração de três meses com proporção macho:fêmeas média de 1:22 (01 touro para 22 vacas em lotes individuais). A classificação de fertilidade dos touros foi obtida a partir do resultado da taxa de prenhez da EMN. Os touros foram classificados em baixa taxa de prenhez (BP; N=9 com 66,57% prenhez); média taxa de prenhez (MP; N=10 com 76,47% prenhez) e alta taxa de prenhez (AP; N=10 com 84,80% prenhez). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando modelos mistos com auxílio do programa SAS® (9.4 version), com nível de significância de 5%. Não foram observadas diferenças entre os grupos de fertilidade nas TPP e TPD. Os animais do grupo BP apresentaram maior GT ( $P=0,04$ ) em relação aos do grupos MP, já o grupo AP não diferiu dos demais ( $3,78 \pm 0,24^\circ\text{C}$ ,  $3,08 \pm 0,24^\circ\text{C}$  e  $3,33 \pm 0,24^\circ\text{C}$ , respectivamente). Para as análises ultrassonográficas, não foram encontradas diferenças entre os grupos para intensidades de pixel e heterogeneidade do parênquima testicular, assim como o diâmetro da artéria testicular, VPS e VPD. Foram observados menores valores de IR e IP no grupo BP ( $P<0,05$ ) quando comparado com os grupos MP e AP, que não diferiram entre si ( $0,48 \pm 0,03$ ,  $0,58 \pm 0,03$ ,  $0,57 \pm 0,03$ ; e  $0,69 \pm 0,08$ ,  $0,96 \pm 0,08$ ,  $0,93 \pm 0,08$ , respectivamente). Os IR e IP representam a dificuldade do sangue percorrer o vaso sanguíneo, entretanto estudos sugerem que o maior comprimento da artéria testicular e a menor velocidade do fluxo sanguíneo podem ser necessários para a termorregulação dos touros da raça Nelore, isso explicaria os maiores valores nos grupos de touros de MP e AP. Diante disso, neste estudo é possível concluir que a termografia infravermelha e a ultrassonografia em modo B não fornecem parâmetros relevantes na escolha e seleção de um reprodutor antes da estação de monta natural. Já os índices de pulsatilidade e índice de resistibilidade fornecidos por ultrassonografia Doppler podem ser considerados parâmetros de bom potencial reprodutivo de touros Nelore.

**Palavras-chave** *Bos indicus*, fertilidade bovina, Índices vasculares, Nelore.

## Use of infrared thermography, B-mode, and Doppler ultrasonography as complementary techniques to the andrological examination of cattle bulls

Marcelo Sant'Ana Borges<sup>1\*</sup>, Marina de Oliveira Silva<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>1</sup>, Naiara Nantes Rodrigues<sup>1</sup>, Leticia Padovani da Silva<sup>2</sup>, Jaine Martelo Pagoto<sup>1</sup>, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante<sup>2</sup>, Fabio Morato Monteiro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UNESP – FCAV, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>2</sup>IZ – Instituto de Zootecnia, Centro avançado de pesquisa e desenvolvimento de bovinos de corte, Sertãozinho, SP, Brasil

\*E-mail: borges.msa@gmail.com

The use of complementary techniques to the andrological examination has increased in recent years, mainly with the aim of characteristic with the potential to predict bovine fertility. Therefore, the objective of this study was to evaluate the potential of infrared thermography, B-mode, and Doppler ultrasound as complementary techniques for identifying differential characteristics between Nellore bulls with different pregnancy rates. Twenty-nine bulls aged between 2 and 4 years old and initial average body weight of 546±79 kg were used. During the routines, infrared thermography evaluations were performed using a portable thermographic camera (FLIR T420, FLIR Systems Inc.) and the images were analyzed with the software Research IR® 4, to measure the temperature of the proximal pole (TPP, °C) and of the distal pole (TDP, °C) of the scrotum. From this, the temperature gradient (TG, °C) was calculated by the difference between TPP and TPD. The ultrasound images were captured using portable ultrasound equipment (Mindray Z5®) coupled to a linear transducer on a frequency of 7.5 MHz. The B-mode images were captured in the longitudinal and transversal planes of the testes, whereas the Doppler-mode images were performed in the spermatic cord. Subsequently, the images were analyzed using the software Image Pro Plus 7.0TM (Media Cybernetics Inc.) resulting in minimum, average and maximum pixel intensity and testicular parenchyma heterogeneity. With the Doppler ultrasound images, the testicular artery diameter (cm), peak systolic velocity (PSV, cm/s), peak diastolic velocity (PDV, cm/s), resistibility index (RI) and pulsatility index (PI). The animals participated in the natural breeding season (NBS) with duration of three months and an average male:female ratio of 1:22 (01 bull for 22 cows in individual lots). The fertility classification of the bulls was obtained through the result of the pregnancy rate of the NBS. The bulls were classified in three groups: a low pregnancy rate (LP; N=9 with 66.57% pregnancy); medium pregnancy rate (MP; N=10 with 76.47% pregnancy) and high pregnancy rate (HP; N=10 with 84.80% pregnancy). The data obtained were submitted to analysis of variance using mixed models with the aid of the SAS® program (9.4 version), with a significance level of 5%. No differences were observed between the fertility groups in TPP and TDP. The animals in the LP group had higher GT ( $P=0.04$ ) than to MP groups, while the HP group did not differ from the others ( $3.78\pm 0.24^{\circ}\text{C}$ ,  $3.08\pm 0.24^{\circ}\text{C}$  and  $3.33\pm 0.24^{\circ}\text{C}$ , respectively). For ultrasound analyses, no differences were found between groups for pixels intensities and testicular parenchyma heterogeneity, as well as testicular artery diameter, PSV, and PDV. Lower RI and PI values were observed in the LP group ( $P<0.05$ ) when compared to the MP and HP groups, which did not differ from each other ( $0.48\pm 0.03$ ,  $0.58\pm 0.03$ ,  $0.57\pm 0.03$ , and  $0.69\pm 0.08$ ,  $0.96\pm 0.08$ ,  $0.93\pm 0.08$ , respectively). The RI and IP represent the difficulty of the blood to travel through the blood vessel, however studies suggest that the greater length of the testicular artery and the lower blood flow velocity may be necessary for the thermoregulation of Nellore bulls, this would explain the higher values in the groups of bulls from MP and AP. Therefore, in this study is possible to conclude that infrared thermography and B-mode ultrasound do not provide relevant parameters in the choice and selection of a sire before the natural breeding season. In contrast, the pulsatility index and resistibility index provided by Doppler ultrasound can be considered parameters of good reproductive potential of Nellore bulls.

**Keywords:** *Bos indicus*, bovine fertility, Nellore, vascular indices.

## Viabilidade dos espermatozoides refrigerados a 5°C por 120 horas: eficiência de diferentes diluidores na manutenção do sêmen bubalino para utilização na IATF

Jaci de Almeida<sup>1\*</sup>, Marc Henry<sup>2</sup> (*In memoriam*), Osvaldo Almeida Resende<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Barra Mansa - UBM, Barra Mansa, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>3</sup>Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, Brasil  
\*E-mail: jaciveterinariorj@gmail.com

Para aumentar a eficácia da refrigeração de gametas, diluidores são adicionados como substâncias capazes de proteger as estruturas dos espermatozoides das injúrias provenientes do abaixamento da temperatura. Independente de diluente, taxa de diluição e temperatura de armazenamento observa-se maior redução da qualidade espermática à medida que aumenta o tempo de incubação. As principais ocorrências observadas são reduções nas taxas de motilidade e integridade morfológica dos gametas. Eventos estes, provavelmente estimulados pelo acúmulo de produtos do metabolismo, principalmente ROS, que diminuem o transporte e a sobrevivência dos espermatozoides no trato genital feminino. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi verificar a efetividade de diferentes diluidores utilizados para a refrigeração do sêmen bubalino, em relação à manutenção da longevidade espermática ao longo do processamento. Amostras seminais de 11 reprodutores da raça Murrah com idade de 4 a 6 anos foram preservadas a 5°C por 120 horas, em sistema passivo de refrigeração (balcão frigorífico). Na pesquisa foram utilizados os diluidores Tris com 10% LDL (substituindo a gema de ovo), Tolera D<sup>®</sup> (lecitina de soja substituindo a gema de ovo) e Botu-Bov<sup>®</sup>. A avaliação da motilidade espermática imediatamente pós-diluição final foi realizada de forma subjetiva (microscópio de contraste de fase Nikon 200 - T0 horas). Para as avaliações subsequentes (T1, T24, T48, T72, T96 e T120 horas pós-diluição com refrigeração à 5°C) uma palheta de 0,5 mL depositada em tubo Eppendorf<sup>®</sup> de 1,5 mL e incubada em “banho-seco” a 37°C/5 minutos, até serem submetidas à análise da motilidade pelo sistema computadorizada CASA (modelo Sperm Class Analyzer - SCA<sup>®</sup> v.4.0). O Setup utilizado para análise do sêmen de búfalos foi: área da partícula (20 a 70 microns<sup>2</sup>), VCL (10 < Slow < 25 e Medium < 50), Progressividade (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Pontos para o VAP (5) e Conectividade (12). Para a análise CASA, gotas de 5 µL de cada amostra foram colocadas entre lâmina e lamínula, previamente mantidas a 37°C, sendo utilizados para a análise de cada amostra 5 campos capturados, homogêneos, com um mínimo de 200 células espermáticas em cada um deles (Almeida, J. Tese, UFMG, 195p., 2018). Já o teste hiposmótico (HOST), foi avaliado até 72 horas, conforme recomendações técnicas (Melo et al., Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 57:(6), 757-63, 2005). O desenho amostral foi desenvolvido utilizando 3 extensores, 6 avaliações realizadas em diferentes momentos e 11 reprodutores, configurando um esquema de blocagem, caracterizando três fontes de variação (diluidor, tempo de refrigeração e touro). Por se tratar de um desenho em blocos ao acaso com medidas repetidas em cada tratamento e animal, foi usado o teste de Friedman, sendo este realizado comparando par a par (comparação via “pairwise”). O pacote estatístico utilizado foi o STATA 12.0 Statistical Analysis Software (Statacorp, 2012). Os valores obtidos foram submetidos ao Teste de Friedman (p<0,05). Foram obtidos os seguintes valores médios para os diluidores **Tris com 10% LDL**, **Tolera D<sup>®</sup>** e **Botu-Bov<sup>®</sup>**, nos tempos pós-diluição e refrigeração para motilidade progressiva: T1hs = 81,4<sup>a</sup>, 79,5<sup>a</sup> e 82,2<sup>ao</sup>; T24hs = 72,8<sup>a</sup>, 64,8<sup>b</sup> e 75,8<sup>ao</sup>; T48hs = 64,2<sup>a</sup>, 62,4<sup>a</sup> e 67,2<sup>ao</sup>; T72hs = 50,4<sup>ab</sup>, 48,5<sup>b</sup> e 61,2<sup>ao</sup>; T96hs = 35,0<sup>b</sup>, 29,6<sup>b</sup> e 48,5<sup>ao</sup>; T120hs = 21,6<sup>b</sup>, 23,1<sup>b</sup> e 34,6<sup>ao</sup>; e HOST: T1hs = 81,5<sup>b</sup>, 92,3<sup>ab</sup> e 92,9<sup>ao</sup>; T24hs = 83,1<sup>b</sup>, 83,6<sup>b</sup> e 86,8<sup>ao</sup>; T48hs = 75,7<sup>b</sup>, 76,6<sup>b</sup> e 80,1<sup>ao</sup>; T72hs = 68,4<sup>b</sup>, 69,6<sup>b</sup> e 73,4<sup>ao</sup>. Os resultados alcançados demonstram, que, em relação a motilidade progressiva (até 120 horas) e integridade de membrana espermática (até 72 horas) houve melhor preservação das amostras mantidas sob refrigeração com o diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> à 5°C, conferindo maior proteção contra injúrias. Com base nos resultados é possível concluir que o diluidor Botu-Bov<sup>®</sup> mostrou potencial *in vitro* para manter a qualidade do sêmen (motilidade individual, viabilidade e integridade da membrana espermática), durante a refrigeração à 5°C. Portanto, pode ser usado como alternativa em programas de IA e IATF de búfalos por até 48 horas, visando melhorar as taxas de prenhes.

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

## Viability of spermatozoa refrigerated at 5°C up to 120 hours: efficiency of different extenders in the maintenance of buffalo semen for use in FTAI

Jaci de Almeida<sup>1\*</sup>, Marc Henry<sup>2</sup> (*In memoriam*), Osvaldo Almeida Resende<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Universitário de Barra Mansa - UBM, Barra Mansa, RJ, Brasil; <sup>2</sup>Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil; <sup>3</sup>Embrapa Agrobiologia/Seropédica, Seropédica, RJ, Brasil.

\*E-mail: jaciveterinarioj@gmail.com

To increase the effectiveness of gametes cooling, extenders containing substances capable of protecting the sperm structures from injuries resulting from the reduction in temperature are used. Regardless of the extender, dilution rate and storage temperature, a greater reduction in sperm quality is observed as the incubation time increases. The main observed occurrences are reductions in the motility rates and morphological integrity of gametes. These events are probably stimulated by the accumulation of metabolic products, mainly ROS, which decrease the transport and survival of sperm in the female genital tract. In this context, the objective of the present study was to verify the effectiveness of different extenders used for the cooling of buffalo semen, in relation to the maintenance of sperm longevity during processing. Seminal samples from 11 Murrah bulls aged 4 to 6 years were preserved at 5°C up to 120 hours in a passive refrigeration system (refrigerator) using TRIS extenders with 10% LDL (replacing the egg yolk), Tolera D<sup>®</sup> (soy lecithin replacing egg yolk) and (Botu-Bov<sup>®</sup>). The assessment of sperm motility immediately after the final dilution was performed subjectively (Nikon 200 phase contrast microscope - T0 hours). For subsequent evaluations (T1, T24, T48, T72, T96 and T120 hours post-dilution with refrigeration at 5°C) a 0,5 mL straw was deposited in a 1.5 mL Eppendorf<sup>®</sup> tube and incubated in a “dry bath” at 37°C/5 minutes, until they are submitted to motility analysis by the CASA computerized system (Sperm Class Analyzer - SCA<sup>®</sup> v.4.0 model). The Setup used for the analysis of buffalo semen was: particle area (20 to 70 microns<sup>2</sup>), LCV (10 < Slow < 25 and Medium < 50), Progressivity (> 70% STR), Circular (< 50% LIN), Points for VAP (5) and Connectivity (12). For the CASA analysis, drops of 5 µL of each sample were placed between the slide and the coverslip, previously kept at 37°C, being used for the analysis of each sample 5 captured fields, homogeneous, with a minimum of 200 sperm cells in each one their (Almeida, J. Thesis, UFMG, 195p., 2018). The hyposmotic test (HOST) was evaluated up to 72 hours, as recommended by (Melo et al., Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 57:(6), 757-63, 2005). The sample design was developed using 3 extenders, 6 evaluations performed at different times and 11 sires, configuring a blocking scheme, featuring three sources of variation (extender, cooling time and bull). Because it was a randomized block design with repeated measurements in each treatment and animal, the Friedman test was used, which was performed by comparing pairs (pairwise comparison). The statistical package used was the STATA 12.0 Statistical Analysis Software (Statacorp, 2012). The values obtained were submitted to the Friedman Test (p<0.05). The following mean values were obtained for the **Tris extenders with 10% LDL, Tolera D<sup>®</sup> and Botu-Bov<sup>®</sup>**, in the post-dilution and refrigeration times for progressive motility: T1hs = 81.4<sup>a</sup>, 79.5<sup>a</sup> and 82.2<sup>a0%</sup>; T24hs = 72.8<sup>a</sup>, 64.8<sup>b</sup> and 75.8<sup>a0%</sup>; T48hs = 64.2<sup>a</sup>, 62.4<sup>a</sup> and 67.2<sup>a0%</sup>; T72hs = 50.4<sup>ab</sup>, 48.5<sup>b</sup> and 61.2<sup>a0%</sup>; T96hs = 35.0<sup>b</sup>, 29.6<sup>b</sup> and 48.5<sup>a0%</sup>; T120hs = 21.6<sup>b</sup>, 23.1<sup>b</sup> and 34.6<sup>a0%</sup>; and HOST: T1hs = 81.5<sup>b</sup>, 92.3<sup>ab</sup> and 92.9<sup>a0%</sup>; T24hs = 83.1<sup>b</sup>, 83.6<sup>b</sup> and 86.8<sup>a0%</sup>; T48hs = 75.7<sup>b</sup>, 76.6<sup>b</sup> and 80.1<sup>a0%</sup>; T72hs = 68.4<sup>b</sup>, 69.6<sup>b</sup> and 73.4<sup>a0%</sup>. From the results achieved, it can be concluded that there was better preservation of samples kept under refrigeration with the Botu-Bov<sup>®</sup> extender at 5°C/120 hours, providing greater protection against injuries and spermatic membrane integrity, when compared to other extenders. A similar result was found for this extender in relation to the integrity of the sperm membrane by the HOST refrigerated at 5°C for up to 72 hours. Based on the results obtained, it is possible to conclude that the Botu-Bov<sup>®</sup> extender showed in vitro potential to maintain semen quality (individual motility, viability and sperm membrane integrity) during refrigeration at 5°C. Therefore, it can be used as an alternative in buffalo AI and FTAI programs for up to 48 hours, aiming to improve pregnancy rates.

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