

## Avaliação da concentração, morfologia e cinética espermática de ovinos após biópsias sequenciais testiculares

Paula Zanin Rattes<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Henry David Mogollón Garcia<sup>1</sup>, Jaqueline Cândido Carvalho<sup>1,2</sup>, Renan Denada<sup>1</sup>, Kauane Zorzenon Uzae<sup>1</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>1</sup>, Mariana Belucci Teixeira<sup>1</sup>, John Patrick Kastelic<sup>3</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>Universidade Santo Amaro.

<sup>3</sup>Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canadá

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

A biópsia testicular é uma importante técnica complementar ao exame andrológico. Contudo, não se sabe a consequência da sua realização sequencial em curtos intervalos. Nosso objetivo foi avaliar a concentração, morfologia, cinética espermáticas de ovinos 28 dias após a realização sequencial de seis biópsias testiculares. Seis carneiros (Dorper x Santa Inês) de 18 meses foram utilizados. Os machos foram acomodados em baias com dieta balanceada e água *ad libitum*. As biópsias testiculares foram realizadas com agulha TRU-CUT 16 G (Unit, São Paulo, Brasil) nos momentos 0 (M0 = primeira biópsia), 3, 6, 12, 24 e 48 horas, alternando-se os testículos a cada colheita. Antes da primeira biópsia, os carneiros receberam antibiótico (penicilina G benzatina; 20.000 UI/kg - dose única) e anti-inflamatório (flunixin meglumine; 1,1 mg/kg a cada 24 h por 3 dias). Antes de cada biópsia, foi realizada assepsia e anestesia local (botão anestésico com 1 mL de lidocaína 2%) da pele escrotal. O sêmen foi colhido com vagina artificial antes (M0) e 28 dias após a primeira biópsia. A cada colheita, foram avaliadas a concentração (câmara de Neubauer), morfologia (preparação úmida sob microscopia de contraste de interferência diferencial), e cinética espermáticas (CASA - *Hamilton Thorne Sperm Analyzer*). A comparação entre os momentos M0 e 28 dias foi realizada pelo Teste t pareado, para dados paramétricos (volume, concentração, defeitos menores e cinética espermática), e Wilcoxon, para dados não paramétricos (defeitos totais, defeitos maiores e motilidade progressiva). Com exceção da amplitude do movimento lateral de cabeça, que foi maior no M0 ( $P < 0,05$ ), as demais variáveis foram semelhantes nos dois momentos ( $P > 0,05$ ). Complicações trans ou pós-cirúrgicas não foram observadas. Concluiu-se que biópsias testiculares sequenciais realizadas com agulhas TRU-CUT não afetam a qualidade seminal nos primeiros 28 dias após a realização.

**Palavras-chaves:** TRU-CUT, avaliação andrológica, sêmen

**Agradecimentos:** CAPES (fomento nº 0001), FAPESP (processo nº 2018/02007-6) e CNPq (processo nº 2021/3845-4).

## Evaluation of sperm concentration, morphology and kinetics of rams after sequential testicular biopsies

Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Paula Zanin Rattes<sup>1</sup>, Henry David Mogollón Garcia<sup>1</sup>, Jaqueline Cândido Carvalho<sup>1,2</sup>, Renan Denadai<sup>1</sup>, Kauane Zorzenon Uzae<sup>1</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>1</sup>, Mariana Belucci Teixeira<sup>1</sup>, John Patrick Kastelic<sup>3</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>Santo Amaro University

<sup>3</sup>Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, AB, Canadá

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

Testicular biopsy is an important technique that complements the andrological examination. However, the consequence of its sequential performance at short intervals is not known. Our objective was to evaluate the concentration, morphology, and sperm kinetics of rams after 28 days of sequential testicular biopsies. Six 18-month-old rams (Dorper x Santa Inês) were used. Males were housed in pens and fed a balanced diet and water *ad libitum*. Testicular biopsies were performed with a TRU-CUT 16 G needle (Unit, São Paulo, Brazil) at 0 (M0 = first biopsy), 3, 6, 12, 24, and 48 hours, alternating the testis at each collection. Before the first biopsy, rams received antibiotics (penicillin G benzathine; 20.000 IU/kg) and anti-inflammatory drugs (flunixin meglumine; 1.1 mg/kg every 24 h for 3 consecutive days). Before each biopsy, asepsis and local anesthesia (anesthetic button with 1 mL of 2% lidocaine) were performed on scrotal skin. Semen was collected with an artificial vagina before (M0) and 28 days after the first biopsy. At each collection, the concentration (Neubauer counting chamber), morphology (differential interference contrast microscopy), and sperm kinetics (CASA - Hamilton Thorne Sperm Analyzer) were evaluated. The comparison between moments was performed using the paired t-test, for parametric data (volume, concentration, minor defects, and sperm kinetics) and Wilcoxon test, for nonparametric data (total defects, major defects, and progressive motility). Except for the amplitude of lateral head movement, which was greater in M0 ( $P < 0.05$ ), the other variables were similar in both moments ( $P > 0.05$ ). Trans or post-surgical complications were not observed. It was concluded that sequential testicular biopsies performed with TRU-CUT needles do not affect seminal quality in the first 28 days after their realization.

**Keywords:** TRU-CUT, andrological evaluation, semen

**Acknowledgements:** CAPES (Grant #0001), FAPESP (Grant #2018/02007-6) e CNPq (Grant # 2021/3845-4).

## Efeitos da adição de diluente seminal em avaliação de espermatozoides de epidídimo pós-estresse térmico testicular em carneiros (*Ovis Aries*)

Guilherme Rizzoto<sup>1\*</sup>, Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Viviane Maria Codognoto<sup>1</sup>, Henry David Mogollon-Garcia<sup>1</sup>, Marina Belucci Teixeira<sup>1</sup>, Jaqueline Candido de Carvalho<sup>1</sup>, Paula Zanin Rattes<sup>1</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>, Pedro Henrique Esteves Trindade<sup>1</sup>, John Patric Kastelic<sup>2</sup> e 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 Saúde Animal de Produção, Faculdade de Medicina Veterinária, UCalgary, Calgary, AB., Canadá

\*E-mail: g.rizzoto@unesp.br

O estresse térmico (ET) testicular, um importante problema em ruminantes, afeta a espermatogênese, reduz a qualidade seminal e impacta a fertilidade. Estudos recentes indicam que determinadas substâncias têm potencial de contrabalançar os impactos do ET na qualidade seminal. Além disso, é também sabido que o ET afeta os espermatozoides epididimários. A hipótese do presente estudo é que a utilização de diluente seminal tem potencial de melhorar a motilidade de espermatozoides epididimários coletados em diferentes momentos pós-ET. Foram utilizados 20 carneiros mestiços, previamente aprovados em exame andrológico. O estudo contou com quatro grupos experimentais com diferentes tempos de insulação escrotal e momentos de castração: grupo CO (n=5, não insulado e castração imediata); grupo 24h (n=5, insulação por 24h seguida de castração imediata); grupo 48h (n=5, insulação por 48h seguida de castração imediata), grupo 7d (n=5, insulação por 48h e castração 7 d pós-insulação). A insulação escrotal causou um aumento de ~5 °C na temperatura testicular. Imediatamente após a castração, o sêmen epididimário foi coletado através de retro-lavagem. As amostras foram então divididas em duas alíquotas, que foram diluídas em PBS (G1) ou diluente (G2) comercial (Botubov®). A seguir, foi determinada a motilidade total (MT) por análise espermática computadorizada (CASA - IVOS, versão 14, Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, EUA). Todos os resultados foram avaliados quanto a normalidade, sendo então comparados G1 e G2 nos diferentes momentos através de teste T de Student. Diferenças estatísticas foram consideradas quando  $P < 0,05$  e os resultados estão apresentados na forma de Média±EPM. No grupo CO (sem-insulação), não se observou diferença entre G1 e G2 (MT: 84±4 vs 92,67±1,2%,  $P > 0,05$ ). No entanto, foram observadas diferenças ( $P < 0,001$ ) quando comparados G1 vs G2 nos grupos 24h (MT: 39,2±6,3 vs 85,3±3,7%), 48h (MT: 26,38±6,8 vs 91,67±4,95%) e 7d (MT: 33,2±8,1 vs 83,33±8,8%). Houve incremento da MT com a adição do diluente seminal nas amostras coletadas pós-ET em todos os grupos estudados. Tal resultado advém, possivelmente, da correção de desequilíbrios bioquímicos gerados pelo ET nas células espermáticas e fluido epididimário (ex., elevação de radicais livres e modificações de pH). Componentes presentes no diluente seminal, como açúcares, tampões, gema de ovo, ácido cítrico e glicerol, têm potencial de corrigir as possíveis alterações causadas pelo ET epididimário, que resultam na redução da motilidade. Recomenda-se, portanto, que as técnicas de coletas e manipulação dos espermatozoides epididimário sejam sempre padronizadas e que as comparações dos resultados de diferentes trabalhos seja sempre realizada considerando a possibilidade da motilidade espermática ser influenciada pela constituição do diluente seminal empregado.

**Palavras-chave:** Estresse térmico, testículo, qualidade seminal.

## Effects of extender on sperm harvested from epididymis after testicular heat stress in rams (*Ovis Aries*)

Guilherme Rizzoto<sup>1\*</sup>, Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Viviane Maria Codognoto<sup>1</sup>, Henry David Mogollon-Garcia<sup>1</sup>, Marina Belucci Teixeira<sup>1</sup>, Jaqueline Candido de Carvalho<sup>1</sup>, Paula Zanin Rattes<sup>1</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>, Pedro Henrique Esteves Trindade<sup>1</sup>, John Patric Kastelic<sup>2</sup> e João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP - FMVZ Botucatu, São Paulo, Brazil). <sup>2</sup>Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

\*E-mail: g.rizzoto@unesp.br

Testicular heat stress (HS) is an important problem in ruminants, since it reduces sperm quality, besides impacting fertility. Recent studies indicated candidate substances added to sperm that could counterbalance the impacts observed in sperm quality post-HS. Furthermore, it's known that HS impacts sperm cells stored in the epididymis. The hypothesis is that the components present in commercial extenders can improve the motility of epididymal sperm harvested at different timepoints post-HS. In this study, 20 reproductively sound rams were used. The study had four experimental groups regarding insulation time and moment of castration, being them: Group CO (n=5, non-insulated and immediate castration); group 24h (n=5, 24h of insulation and immediate castration); group 48h (n=5, 48h of insulation and immediate castration) and group 7d (n=5, 48h insulation and castration at 7d post-insulation). With exception of the CO group (non-insulated), an increase of ~5°C was observed. Besides the CO group (non-insulated, n=5), an increase in the testicular temperature was induced through insulation (24-48h); the increase was ~5 °C. The animals were castrated at different timepoints post-insulation (24, 48, and 7d). Immediately after castration, sperm from the epididymis was harvested via flushing. The samples were then divided into two aliquots and extended in either PBS (G1) or commercial extender (Botubov®), and total motility (TM) was immediately evaluated using the CASA system (IVOS, version 14, Hamilton-Thorne Bioscience®, Beverly, MA, EUA). All results were evaluated regarding normality, been then the results compared between G1 and G2 at the different timepoints using Student's T-test. Statistical differences were considered when P<0.05. All results presented follow the pattern Mean±SEM. At the CO moment (no-insulation), there's no difference between TM for G1 and G2 (84±4 vs 92.67±1.2, P>0.05). However, important differences were observed (P<0.001) when comparing G1 and G2 at 24h (TM:39.2±6.3 vs 85.3±3.7), 48h (TM:26.38±6.8 vs 91.67±4.9) and 7d (TM:33.2±8.1 vs 83.33±8.8). There's a remarkable increase in TM caused by the addition of an extender on the samples harvested post-HS for the entire duration of the study. Such results arise, likely from the correction of cellular metabolic imbalances generated by the HS on sperm cells and epididymal fluid (e.g.: increase in reactive O2 species and pH modification). The components present in the sperm extender, such as sugars, buffers, egg yolk, citric acid and glycerol have the potential to counterbalance the possible modifications generated by epididymal HS, which result in reduced sperm motility. Therefore, it's suggested that a technique for sperm collection and handling of epididymal sperm cells should be standardized to avoid bias in the comparisons of different studies, considering the possibility of sperm motility being influenced by the constitution of the extender used.

**Keywords:** Heat stress, testes, sperm quality.

## Efeito de parâmetros climáticos na velocidade do fluxo sanguíneo testicular de ovinos Santa Inês criados em clima tropical úmido

Juliana Nascimento Duarte Rodrigues<sup>1\*</sup>, José Domingos Guimarães<sup>1</sup>, Paulo Sergio Cerqueira Rangel<sup>1</sup>, Jeferson Ferreira Fonseca<sup>2</sup>, Maria Emília Franco Oliveira<sup>3</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFV, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil;

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>4</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil

\*E-mail: julianarodriguesmv@gmail.com

O clima tropical úmido é caracterizado por altas temperatura e umidade relativa do ar, o que pode gerar desconforto térmico nos animais de produção e alterar seus mecanismos fisiológicos de termorregulação. A troca de calor por contracorrente entre artéria e veias é um dos principais mecanismos de termorregulação testicular em ovinos e o fluxo sanguíneo dessa região anatômica pode ser avaliado com auxílio de ultrassonografia Doppler. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito das variações microclimáticas durante distintas estações sobre a taxa de fluxo em alta velocidade dos vasos sanguíneos dos cordões espermáticos de reprodutores ovinos deslanados criados em clima tropical úmido. O estudo foi realizado em Belém, PA, Brasil (1°27'S, 48°26'W, altitude 14 metros), local de clima tropical úmido (Afi de Koppen), e conduzido em duas estações climáticas: estação mais chuvosa (fevereiro e março) e estação menos chuvosa (agosto e setembro). Foram utilizados 8 carneiros Santa Inês, hípidos e aptos à reprodução, criados em sistema semi-intensivo. As coletas de dados foram realizadas durante seis semanas consecutivas por estação climática, sendo executadas duas vezes por semana, com três repetições por animal, em momentos distintos, em cada dia de avaliação. Os animais eram recolhidos para o abrigo uma hora antes de cada coleta de dados para estabilização dos parâmetros fisiológicos de acordo com o ambiente. Dados microclimáticos de temperatura do ar (AT; °C) e umidade relativa (RH; %) foram registrados com estação meteorológica digital instalada no local de coleta e o Índice de Temperatura e Umidade (THI), calculado conforme a equação  $THI = [(0.8AT) + RH*(AT - 14.3) + 46.3]$ . Os animais foram conduzidos ao local de análise imediatamente antes das avaliações. Imagens ultrassonográficas em modo Doppler colorido do cordão espermático em ambos antímeros foram registradas (transdutor em posição longitudinal, frequência de 6.6 MHz) e avaliadas com uso do software analítico Image-Pro Plus® (Media Cybernetics Inc., San Diego, EUA) para determinar a taxa de fluxo em alta velocidade (HVFR) de vasos sanguíneos dos cordões espermáticos, expressa em porcentagem (%). As estações mais chuvosa e menos chuvosa apresentaram, respectivamente: temperatura do ar de 28.0±0.3 e 30.9±0.3°C; umidade relativa de 84.1±0.9 e 69.9±0.9%; THI de 80.0±0.5 e 82.5±0.7; e HVFR de 71.0 ±1.0 e 61.0±1.0%. A temperatura do ar e o THI foram superiores (P<0.05) na estação menos chuvosa, enquanto a umidade relativa do ar foi maior (P<0.05) na estação mais chuvosa. A HVFR foi superior (P<0.05) na estação chuvosa, o que sugere que nesta estação há uma maior demanda de irrigação testicular, podendo ser causada por um aumento no metabolismo celular testicular ou alteração da conformação dos vasos por mecanismos termorregulatórios. A taxa de fluxo em alta velocidade testicular foi superior na estação chuvosa, caracterizada por maior umidade relativa e menor temperatura do ar e THI em relação à estação menos chuvosa.

**Palavras-chave:** temperatura do ar; umidade relativa; ultrassonografia Doppler; conforto térmico; ovinos deslanados.

## Effect of climatic parameters on the velocity of testicular blood flow of Santa Inês rams reared in humid tropical climate

Juliana Nascimento Duarte Rodrigues<sup>1\*</sup>, José Domingos Guimarães<sup>1</sup>, Paulo Sergio Cerqueira Rangel<sup>1</sup>, Jeferson Ferreira Fonseca<sup>2</sup>, Maria Emília Franco Oliveira<sup>3</sup>, Alexandre Rossetto Garcia<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – UFV, Viçosa, MG, Brasil; <sup>2</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, Brasil;

<sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil; <sup>4</sup>Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil

\*E-mail: julianarodriguesmv@gmail.com

The humid tropical climate is characterized by high air temperature and relative humidity, which can generate thermal discomfort in production animals and alter their physiological thermoregulation mechanisms. The heat exchange by countercurrent between artery and veins is one of the main mechanisms of testicular thermoregulation in rams and their blood flow can be evaluated using mode Doppler ultrasonography. Thus, the objective was to evaluate the effect of microclimatic variations during different seasons on the high-velocity flow rate (HVFR) of blood vessels of the spermatic cords of hair sheep breeders reared in the humid tropical climate. The study was conducted in Belém, PA, Brazil (1°27'S, 48°26'W, altitude of 14 meters), humid tropical climate (Afi of Koppen), and conducted in two climatic seasons: rainy season (February and March) and less rainy season (August and September). Eight Santa Inês rams, healthy and able to reproduce, reared in a semi-intensive system were used. Data were collected during six consecutive weeks per climatic season, twice a week, with three replicates per animal, at different times, on each evaluation day. The animals were conducted to a shelter shed one hour before each data collection to stabilize physiological parameters according to the environment. Microclimatic data of air temperature (AT; °C) and relative humidity (RH; %) were recorded with a digital meteorological station installed at the collection site, and the Temperature and Humidity Index (THI) was calculated according to the equation  $THI = [(0.8AT) + RH*(AT - 14.3) + 46.3]$ . The animals were taken to the shelter shed immediately before the evaluations. Color Doppler images of the spermatic cord in both antimers were recorded (transducer in longitudinal position, frequency of 6.6 MHz) and evaluated using the Image-Pro Plus® analytical software (Media Cybernetics Inc., San Diego, USA) to determine the high-velocity flow rate of blood vessels of the sperm cords, expressed as a percentage (%). The rainy season and less rainy seasons presented, respectively: air temperature of 28.0±0.3 and 30.9±0.3°C; relative humidity of 84.1±0.9 and 69.9±0.9%; THI of 80.0±0.5 and 82.5±0.7; and HVFR of 71.0 ±1.0 and 61.0±1.0%. Air temperature and THI were higher (P<0.05) in the less rainy season, while relative air humidity was higher (P<0.05) in the rainy season. The HVFR was higher (P<0.05) in the rainy season, which suggests that in this season there is a higher demand for testicular irrigation, which may be caused by an increase in testicular cellular metabolism or alteration of vessel conformation by thermoregulatory mechanisms. The testicular high-velocity flow rate was higher in the rainy season, characterized by higher relative humidity and lower air temperature and THI in relation to the less rainy season.

**Keywords:** air temperature; relative humidity; Doppler ultrasound; thermal comfort; hair sheep.

## Impacto do estresse térmico testicular na ecogenicidade do parênquima testicular e qualidade seminal em carneiros (*Ovis áries*)

Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>1</sup>, Mirela Bondezan de Almeida<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Jaqueline Candido Carvalho<sup>1</sup>, Marina Belucci Teixeira<sup>1</sup>, Renan Denadai<sup>1</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>, John Patric Kastelic<sup>2</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 Saúde Animal de Produção, Faculdade de Medicina Veterinária, UCalgary, Calgary, Alb., Canadá

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

A termorregulação testicular é essencial para a espermatogênese fisiológica e manutenção da qualidade espermática em carneiros. O estresse térmico (ET) causa importantes alterações metabólicas e degeneração das células espermatogênicas, prejudicando a qualidade do sêmen. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos do ET testicular sobre as características ultrassonográficas (Valor numérico dos pixels - NPV e desvio padrão dos pixels - PSD). Oito carneiros adultos saudáveis, aprovados em exame andrológico, foram submetidos à insulação escrotal (fraldas descartáveis) por 51 horas. O exame de ultrassom foi realizado pré-ET (Controle; CO) e imediatamente após a retirada da insulação (pós-IS). Coletas de sêmen foram realizadas utilizando-se vagina artificial antes (CO) e nos dias (D) 14 e 21 pós-IS. O sêmen foi diluído (BotuBOV<sup>®</sup>; 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) e avaliado por CASA (IVOS, versão 14, Hamilton-Thorne Bioscience<sup>®</sup>, Beverly, MA, EUA). A temperatura da superfície escrotal foi mensurada por termografia infravermelha (Flir E53, MSX<sup>®</sup>, Termovisor Brasil<sup>®</sup>, Atibaia-SP, Brasil) realizadas antes e imediatamente após a retirada da insulação. A insulação promoveu o aumento de ~5,2 °C da superfície escrotal, que resultou em rápida deterioração da qualidade seminal evidenciada no D14 caracterizada pela redução das motilidades total e progressiva, aumento da porcentagem de células morfológicamente anormais e diminuição na concentração espermática. Este quadro se agravou, evoluindo para necrospermia no D21. A insulação promoveu o aumento do NPV (CO: 104.6 ± 4.25; pós-IS: 137.9 ± 8.1), sem, contudo, alterar o PSD (CO: 15.98 ± 1.25/ pós-IS 18.3 ± 1.7). O aumento significativo do NPV refletiu as alterações agudas do parênquima testicular provocadas pelo ET, sugerindo que esta avaliação pode ser empregada para avaliar o impacto futuro do ET testicular sobre a qualidade espermática.

**Palavras-chave:** Insulação escrotal, ultrassonografia, intensidade de pixel (IP), espermograma, carneiros.

**Agradecimentos:** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, fomento nº 0001), FAPESP (concedido 2018/02007-6), Botupharma<sup>®</sup> e FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.

## Impact of testicular heat stress on testicular parenchyma echogenicity and sperm quality in rams (*Ovis aries*)

Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Guilherme Rizzoto<sup>1</sup>, Mirela Bondezan de Almeida<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Jaqueline Candido Carvalho<sup>1</sup>, Marina Belucci Teixeira<sup>1</sup>, Renan Denadai<sup>1</sup>, Eunice Oba<sup>1</sup>, John Patric Kastelic<sup>2</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brazil. <sup>2</sup>Department of Production Animal Health, College of Veterinary Medicine, UCalgary, Calgary, Alb., Canada  
\*E-mail: joao.cp.ferreira@unesp.br

Testicular thermoregulation is essential for physiological spermatogenesis and maintenance of sperm quality in rams. Heat stress (HS) causes significant metabolic changes and degeneration of spermatogenic cells, impairing semen quality. Our objective was to evaluate the effects of testicular HS on ultrasonographic characteristics (Numerical Pixels Values - NPVs and Pixel Standard Deviation - PSD). Eight healthy adult rams, approved in a reproductive soundness examination, underwent scrotal insulation (disposable diapers) for 51 hours. The ultrasound examination was performed pre-HS (Control; CO) and immediately after removal of the insulation removal (IR). Semen collections were performed using an artificial vagina before (CO) and on days (D) 14 and 21 post-insulation. Semen was diluted (BotuBOV<sup>®</sup>; 400 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL) and evaluated by CASA (IVOS, version 14, Hamilton-Thorne Bioscience<sup>®</sup>, Beverly, MA, USA). The scrotal surface temperature was monitored by infrared thermography (Flir E53, MSX<sup>®</sup>, Termovisor Brazil<sup>®</sup>, Atibaia-SP, Brazil) performed immediately before and after the insulation removal. Insulation promoted an increase of ~5.2 °C in the scrotal surface, resulting in a rapid deterioration of sperm quality in D14, characterized by total and progressive motility reduction, increase in the percentage of morphologically abnormal cells, and decrease in sperm concentration. This condition evolved to necrospermia on D21. Testicular insulation promoted an increase in NPV (CO: 104.6 ± 4.25; post-IS: 137.9 ± 8.1), without changing the PSD (CO: 15.98 ± 1.25; post-IS 18.3 ± 1.7). The significant increase in NPV reflected the acute changes in the testicular parenchyma caused by HS, suggesting that this assessment can signal the future impact of testicular HS on sperm quality.

**Keywords:** Heat stress, ultrasound, pixel intensity (IP), spermogram, rams.

**Acknowledgements:** Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, grant n° 0001), FAPESP (grant# 2018/02007-6), Botupharma<sup>®</sup> and FMVZ/UNESP – Botucatu-SP.



## Impactos imediatos do estresse térmico testicular sobre a população de espermátides em carneiros (*Ovis aries*)

Marina Belucci Teixeira<sup>1</sup>, Viviane Maria Codognoto<sup>1</sup>, Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Jaqueline Candido de Carvalho<sup>1</sup>, Paula Zanin Rattes<sup>1</sup>, John Patric Kastelic<sup>2</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>1</sup> e Guilherme Rizzoto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil. <sup>2</sup>Departamento de Saúde Animal de Produção, Faculdade de Medicina Veterinária, UCalgary, Calgary, Alb., Canadá

\*E-mail: g.rizzoto@unesp.br

A elevação das temperaturas globais tem levado a um aumento nos episódios de estresse térmico (ET) em animais de produção. A temperatura testicular fisiologicamente deve ser mantida 3-5°C abaixo da corporal, quando este balanço é impactado, observam-se severos danos na qualidade seminal. Estudos recentes demonstraram ativação de rotas apoptóticas pós-ET, com possível degeneração testicular. Dentre os tipos celulares mais sensíveis ao estresse térmico, as espermátides e espermatócitos têm destaque, porém não se conhece o momento preciso em que se inicia o impacto sobre estas células. Nossa hipótese é que o ET gera degeneração testicular e ativa apoptose em espermátides de forma imediata. Neste estudo foram utilizados 25 carneiros, que foram submetidos a estresse térmico por 0 (n = 5), 24 (n=5) ou 48h (n=15) (insulação com fraldas descartáveis). Os animais foram castrados nos seguintes momentos: CO (não insulado), 24h, 48h (n=5), 7d (n=5) ou 14d (n=5) após o início da insulação. O tecido testicular foi processado imediatamente pós-castração, sendo cada testículo pesado e amostras de parênquima foram armazenadas a -80 °C. Como forma de avaliar a concentração de espermátides, o tecido foi descongelado, pesado e sonicado (30s/1ml de H<sub>2</sub>O milliQ). Após a sonicação as amostras foram diluídas em 1:15 v/v e avaliadas na câmara de Neubauer. O valor obtido na concentração de espermátides foi normalizado pelo peso testicular obtendo uma concentração final de espermátides/mg de tecido testicular. Os resultados foram avaliados através de ANOVA seguidos por teste de Tukey. Diferenças eram consideradas significativas quando P<0,05. Foram observadas reduções importantes na concentração de espermátides já as 24hs pós estresse térmico, que se manteve reduzida até o final do estudo (CON 48±4.1\*10<sup>4</sup>/mg vs 20,6±3,5\*10<sup>4</sup>/mg [média dos momentos 24h-14d], P<0,01). Para o peso testicular, foi observada uma diferença significativa quando comparado o grupo CO vs 14d (8,15±0,9 vs 5,2±0,7 g/Kg de peso corporal, P<0,05. Apesar da redução no número de espermátides ter se iniciado com 12h pós-ET, a alteração no peso testicular foi somente observada aos 14d pós-ET, isso ocorreu possivelmente devido a menor sensibilidade de outros tipos celulares ao ET levando mais tempo para iniciar o processo apoptótico. A metodologia utilizada foi fundamental para indicar a velocidade do impacto do ET sobre espermátides e reforça a sensibilidade deste estágio espermatogênico ao ET.

**Palavras-chave:** Estresse térmico, testículo, espermátides.

## Immediate impacts of testicular heat stress on the spermatid population in rams (*Ovis Aries*)

Marina Belucci Teixeira<sup>1</sup>, Viviane Maria Codognoto<sup>1</sup>, Eduardo dos Santos Rossi<sup>1</sup>, Antônio Guilherme Roncada Pupulim<sup>1</sup>, Jaqueline Candido de Carvalho<sup>1</sup>, Paula Zanin Rattes<sup>1</sup>, John Patric Kastelic<sup>2</sup>, João Carlos Pinheiro Ferreira<sup>1</sup> e Guilherme Rizzoto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP - FMVZ Botucatu, São Paulo, Brazil). <sup>2</sup>Department of Production Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

\*E-mail: g.rizzoto@unesp.br

The recent increases in global temperatures led to a higher casualty of heat stress (HS) episodes in production animals. Furthermore, the testicular temperature physiologically has to be kept from 3-5 °C below body core temperature, when this balance is impacted, several impacts are observed in sperm quality. Recent studies demonstrate activation of apoptotic routes post-HS, with possible testicular degeneration. Among the most impacted cell types, spermatids and spermatocytes are the most common, however, the precise time-frame of impact upon these cell types are yet not known. Our hypothesis is that the HS leads to testicular degeneration and has an immediate impact on spermatids. A total of 25 rams were used in the study; the animals were subjected to HS for (n = 5), 24 (n=5) ou 48h (n=15) (insulation with disposable diapers), whereas the CO group was not insulated. The animals were castrated in the following moments: CO (non-insulated), 24h, 48h, 7d (n=5), and 14d (n=5) from the start of insulation. The testicular was processed immediately post-castration, each testis was weighted and samples from the parenchyma were stored at -80 °C. As a tool to evaluate the spermatid concentration, the testicular tissue sonication was used, in detail, the tissue samples were thawed, weighed and sonicated (30s/1ml of H<sub>2</sub>O milliQ). After sonication, the samples were diluted in 1:15 v/v and evaluated in a Neubauer chamber. The final value obtained in the concentration calculation was normalized by testicular weight, reaching a final concentration of spermatids/mg of testicular tissue. The results were analyzed through an ANOVA test followed by a Tukey test. Differences were considered significant when P<0.05. Important reductions in the spermatid concentration were observed already at 24h, maintaining lower levels throughout the study (CON 48±4.1\*10<sup>4</sup>/mg vs 20.6±3.5\*10<sup>4</sup>/mg [average data from 24h-14d], P<0.01). Regarding the testicular weight, a significant difference was observed when comparing CO vs 14d (8.15±0.9 vs 5.2±0.7 g/Kg of body weight, P<0.05). Although the reduction in the number of spermatids was observed at 24h post-HS, the reduction in testicular weight was only observed at 14d post-HS. This find can be explained, possibly, due to the lesser sensibility of the other cell types against the HS, taking more time to start the apoptotic process. The methodology employed was fundamental to indicate the speed of the impact of HS upon spermatids and corroborate with the findings indicating the higher sensibility of this spermatogenic stage to the HS.

**Keywords:** Heat stress, testes, spermatids.

## Nanopartículas de óxido de zinco na congelação de sêmen caprino

Lúcia Cristina Pereira Arruda<sup>1</sup>, Gustavo de Oliveira Alves Pinto<sup>1</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>1</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Andrologia (Androlab) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRP, Recife, PE, Brasil

\*E-mail: carneirogustavo1@gmail.com

O processo de congelamento de sêmen é conhecido como um método que, aumenta a capacidade de armazenamento das células espermáticas a longo prazo em temperaturas muito baixas, entretanto, o sucesso na criopreservação do sêmen depende do tipo de diluente e dos aditivos usados para auxiliar na estabilização das células durante os processos de congelamento e descongelamento, além das taxas de resfriamento e descongelamento e do método de armazenamento utilizados. Durante a criopreservação, os espermatozoides de mamíferos são altamente suscetíveis ao estresse oxidativo, desequilíbrio entre a produção de defesas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Especialmente em caprinos, isto ocorre porque, a membrana plasmática do espermatozoide tem um alto teor de ácidos graxos insaturados que são ricos em fosfolípidios, desencadeando a peroxidação lipídica que leva ao acúmulo de peróxidos de ácidos graxos tóxicos que podem danificar as células, levando a um alto estresse oxidativo. Visando reduzir o estresse oxidativo e os danos as membranas plasmáticas dos espermatozoides, diversos aditivos podem ser acrescentados aos diluentes de congelação do sêmen, as nanopartículas de óxido de zinco são um exemplo. Diferentes estudos relataram o potencial do Zn para a motilidade espermática e melhoria da viabilidade através da eliminação de ROS em diferentes espécies. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar como a adição de nanopartículas de óxido de zinco (nano-ZnO) ao diluidor de congelamento afeta as características da cinética do sêmen de bodes pós-descongelamento. Para esta pesquisa, foram utilizados *pools* seminais de quatro bodes Sannen. Cada *pool* seminal (n= 6) foi diluído em Tris-gema de ovo (5 % glicerol), suplementado com nano-ZnO (0, 50, 100 ou 200 µg/mL), na concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica (5°C/3h), transportadas para o laboratório, onde foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e foram transferidas para o sistema automatizado de congelação (TK3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelação Ltd., Uberaba, Brasil), que já estava estabilizado a temperatura de 5°C, onde então permaneceram por mais 30 min e foram submetidas a curva de congelamento e após armazenadas em botijão de nitrogênio líquido (-196°C). No momento das análises, as amostras de sêmen (2 palhetas) foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 s e processadas para avaliação (diluição 10:30 em Tris-tampão). Todas as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática por sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA). Os dados foram submetidos a análise estatística através do software GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). As variáveis expressas em porcentagens foram transformadas por arco seno (arco seno  $\sqrt{P/100}$ ). Os dados foram inicialmente submetidos a um teste de normalidade (Kolmogorov–Smirnov) para identificar a distribuição dos dados e optar por testes paramétricos ou não paramétricos. Após a identificação, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey-Kramer se paramétrico, ou de Dunn se não paramétrico. Todos os testes descritos foram realizados com nível de confiança de pelo menos 5% ( $p < 0,05$ ). Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais para os parâmetros cinéticos de motilidade progressiva (PM), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) e batimento flagelar cruzado (BCF). Para motilidade total (MT), o grupo tratado com 200 µg/mL de nano-ZnO foi superior ( $p = 0,0209$ ) ao controle. A velocidade curvilínea (VCL), do grupo com 200 µg/mL, foi maior ( $p = 0,0412$ ) que o de 100 µg/mL. Na velocidade em linha reta (VSL), o controle foi melhor ( $p = 0,0365$ ) que o grupo contendo 200 µg/ml de nano-ZnO. Para velocidade média da trajetória (VAP), o controle foi maior ( $p = 0,0475$ ) que 100 µg/ml. Na linearidade (LIN), o controle foi superior ( $p = 0,0249$ ) do que 200 µg/mL. Retilinearidade (STR), o controle e 100 µg/ml de nano-ZnO foram maiores ( $p = 0,0137$ ) ao 200 µg/mL. No wobble (WOB) o controle foi melhor ( $p = 0,0259$ ) que o de 50 µg/mL. Em estudo prévio, realizado por nosso grupo de estudos, com sêmen congelado de ovino, em tris-gema de ovo (5%de glicerol), a adição de nano-ZnO (10, 50, 100 e 200 µg/mL) não provocou mudanças significativas em relação aos parâmetros cinéticos, sendo o mesmo observado no sêmen congelado de humanos, utilizando as mesmas concentrações de nanopartículas de óxido de zinco. Em contrapartida, no presente estudo, houve aumento da motilidade total e redução parâmetros de velocidade e progressividade (VCL, VSL, VAP, LIN, STR e WOB), corroborando com trabalho realizado com sêmen humano que demonstrou efeito tóxico da nano-ZnO [1000 µg/mL]. Mais estudos serão necessários para elucidar qual o mecanismo que está afetando estes parâmetros que podem ser espécie-específicos e por isso os resultados contrários nas diferentes espécies. Em conclusão, a adição de nanopartículas de óxido de zinco ao diluidor de congelamento de sêmen caprino melhora a motilidade total (200 µg/mL) das células, porém afeta negativamente VCL, VSL, VAP, LIN, STR e WOB.

**Palavras-chave** Nanotecnologia, criopreservação, caprinos

## Zinc oxide nanoparticles in the freezing of goat semen

Lúcia Cristina Pereira Arruda<sup>1</sup>, Gustavo de Oliveira Alves Pinto<sup>1</sup>, Gustavo Ferrer Carneiro<sup>1\*</sup>, Maria Madalena Pessoa Guerra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Andrology Laboratory (Androlab) – Veterinary Medicine Department, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, Recife, PE, Brazil

\*E-mail: carneirogustavo1@gmail.com

The semen freezing process is known as a method that increases the storage capacity of the spermatid cells in the long term at very low temperatures, however, the success in cryopreservation of semen depends on the type of diluent and the additives used to aid in the stabilization of cells during freezing and thawing processes, cooling and thawing rates and the storage method used. During cryopreservation, mammalian spermatozoa are highly susceptible to oxidative stress, imbalance between the production of antioxidant defenses and the production of reactive oxygen species (ROS). Especially in goats, this is because, the plasma membrane of sperm has a high content of unsaturated fatty acids that are rich in phospholipids, triggering lipid peroxidation that leads to the accumulation of peroxides of toxic fatty acids that can damage cells, leading to high oxidative stress. In order to reduce oxidative stress and damage to plasma membranes of spermatozoa, several additives can be added to semen freezing diluents, zinc oxide nanoparticles are an example. Different studies have reported the potential of Zn for sperm motility and improved viability by eliminating ROS in different species. Thus, the aim of this study was to evaluate how the addition of zinc oxide nanoparticles (nano-ZnO) to the freezing diluent affects the kinetic characteristics of semen of post-thawing goats. For this research, seminal pools of four Sannen goats were used. Each seminal pool (n= 6) was diluted in Tris-egg yolk (5 % glycerol), supplemented with nano-ZnO (0, 50, 100 or 200 µg/ml), at the final concentration of  $200 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Then, the samples were packed in a thermal box (5°C/3h), transported to the laboratory, where they were packed in 0.25 ml straws and transferred to the automated freezing system (TK3000®, TK Technology in Freezing Ltd., Uberaba, Brasil), which was already stabilized at 5°C, where then remained for another 30 min and were submitted to freezing curve and after storage in liquid nitrogen cylinder (-196 °C). At the time of the analyses, the semen samples (2 reeds) were thawed in a water bath at 37 °C for 30 s and processed for evaluation (dilution 10:30 in Tris-buffer). All samples were evaluated for spermatid kinetics by computerized semen analysis system (CASA). The data were submitted to statistical analysis using the GraphPad InStat software (version 3.10, 2009). The variables expressed in percentages were transformed by sine arc (sine arch  $\sqrt{P/100}$ ). The data were initially submitted to a normality test (Kolmogorov–Smirnov) to identify the distribution of the data and opt for parametric or nonparametric tests. After identification, the data were submitted to variance analysis (ANOVA), followed by Tukey-Kramer's post-test if parametric, or Dunn's if not parametric. All tests described were performed with confidence level of at least 5% ( $p < 0.05$ ). The data is expressed average  $\pm$  standard error. No significant differences were observed ( $p > 0.05$ ) between the experimental groups for the kinetic parameters of progressive motility (PM), amplitude of lateral head displacement (ALH) and beat-cross frequency (BCF). For total motility (TM), the group treated with 200 µg/ml of nano-ZnO was higher ( $p = 0.0209$ ) to the control. The curvilinear velocity (VCL), of the group with 200 µg/ml, was higher ( $p = 0.0412$ ) than that of 100 µg/ml. At straight-line velocity (VSL), the control was better ( $p = 0.0365$ ) than the group containing 200 µg/ml of nano-ZnO. For average path velocity (VAP), the control was higher ( $p = 0.0475$ ) than 100 µg/ml. In linearity (LIN), the control was higher ( $p = 0.0249$ ) than 200 µg/ml. straightness (STR), control and 100 µg/ml of nano-ZnO were higher ( $p = 0.0137$ ) at 200 µg/ml. In wobble (WOB) the control was better ( $p = 0.0259$ ) than 50 µg/ml. In a previous study carried out by our group with frozen sheep semen, in TRIS-egg yolk (5% glycerol), the addition of nano-ZnO (10, 50, 100 and 200 µg/ml) did not cause significant changes in relation to the kinetic parameters, being the same observed in the frozen semen of humans, using the same concentrations of zinc oxide nanoparticles. On the other hand, in the present study, there was an increase in total motility and a reduction in velocity and progressivity parameters (VCL, VSL, VAP, LIN, STR and WOB), corroborating with a study carried out with human semen that demonstrated the toxic effect of nano-ZnO [1000 µg/ml]. Further studies will be needed to elucidate the mechanism that is affecting these parameters that may be species-specific and therefore with opposite results in different species. In conclusion, the addition of zinc oxide nanoparticles to the caprine semen freezing extender improves total motility (200 µg/ml) of cells, but affects negatively VCL, VSL, VAP, LIN, STR and WOB.

**Keywords:** Nanotechnology, cryopreservation, caprine