

Aplicação do sistema CASA (AndroScope®) na avaliação do sêmen de coelhos refrigerado com diferentes concentrações de gema de ovo clarificada

**Shirley Andrea Florez Rodriguez¹, Diego Fernando Dubeibe Marin¹,
Yeifer Julian Vargas Parra¹, Luis Antonio Poloche¹**

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales
E-mail: sflorezr@udca.edu.co

Utilização de sistemas de análise computadorizada de sêmen (CASA), como o AndroScope® (Minitube, Alemanha), tem se consolidado como uma ferramenta objetiva para a avaliação da qualidade espermática, permitindo a quantificação precisa de parâmetros cinéticos em comparação aos métodos subjetivos. O AndroScope® é um sistema portátil baseado no mesmo software empregado em plataformas mais robustas, como o AndroVision®, sendo especialmente útil na análise de múltiplas amostras sob diferentes condições experimentais, embora com menor complexidade operacional. O objetivo foi avaliar a cinética espermática do sêmen de coelho refrigerado a 24 e 48 horas em função de diferentes concentrações de gema de ovo clarificada no diluente. Foram realizadas duas colheitas de quatro machos adultos saudáveis, cujos ejaculados foram obtidos por vagina artificial e combinados em pool seminal. O sêmen foi ajustado para 35×10^6 espermatozoides por dose e diluído em Tris-ácido cítrico-glicose (TCG) com diferentes concentrações de gema de ovo clarificada T1 (0%), T2 (2,5%), T3 (5%), T4 (10%) e T5 (20%). Após processamento, as amostras foram refrigeradas a 5 °C e avaliadas a 24 e 48 horas utilizando o sistema AndroScope® (v.1.1.1.6), com setup para coelho (calibração: 0,55 $\mu\text{m}/\text{pixel}$; profundidade: 20 μm ; área: 10–40 μm). Os dados foram analisados de forma descritiva, considerando tendências entre tratamentos. Observou-se redução da motilidade progressiva e dos parâmetros cinéticos ao longo do tempo em todos os tratamentos. Em T1 foi evidenciada uma redução acentuada (36,46% vs. 12,45%), enquanto T2 se manteve estável (43,07% vs. 42,88%). Em T3 também se observou uma ligeira diminuição (45,37% vs. 41,95%), assim como em T4 (55,76% vs. 53,99%). O tratamento T5 apresentou a maior redução (63,04% vs. 29,91%), sugerindo menor estabilidade espermática ao longo do armazenamento. Em relação aos espermatozoides com movimento circular, T1 apresentou uma diminuição entre 24 e 48 horas (23,31% vs. 7,22%). Em T2 observou-se um aumento (30,02% vs. 34,67%), assim como em T3 (27,87% vs. 31,96%) e T4 (30,25% vs. 40,14%), evidenciando uma tendência de aumento do movimento circular ao longo do tempo. Em contraste, T5 apresentou redução nesse parâmetro (43,64% vs. 22,53%). Nos parâmetros de velocidade, observaram-se reduções entre 24 e 48 horas em todos os tratamentos. Em T1 foi evidenciada uma redução acentuada de VCL (127,45 vs. 53,78 $\mu\text{m}/\text{s}$), VSL (49,13 vs. 15,52 $\mu\text{m}/\text{s}$) e VAP (58,89 vs. 19,74 $\mu\text{m}/\text{s}$), acompanhada de diminuição de ALH (2,72 vs. 1,37 μm) e BCF (14,33 vs. 7,97 Hz). Em T2 também se observou redução de VCL (128,16 vs. 108,25 $\mu\text{m}/\text{s}$), VSL (42,96 vs. 27,79 $\mu\text{m}/\text{s}$) e VAP (52,72 vs. 35,75 $\mu\text{m}/\text{s}$), com diminuição de ALH (2,69 vs. 2,43 μm) e BCF (16,64 vs. 14,36 Hz). De forma semelhante, T3 apresentou reduções em VCL (150,48 vs. 107,70 $\mu\text{m}/\text{s}$), VSL (57,89 vs. 28,77 $\mu\text{m}/\text{s}$) e VAP (70,53 vs. 36,32 $\mu\text{m}/\text{s}$), assim como em ALH (3,10 vs. 2,39 μm) e BCF (18,18 vs. 15,03 Hz). Em T4, observou-se redução em VCL (170,19 vs. 113,72 $\mu\text{m}/\text{s}$), VSL (67,75 vs. 31,29 $\mu\text{m}/\text{s}$) e VAP (79,94 vs. 39,27 $\mu\text{m}/\text{s}$), com diminuição de ALH (3,64 vs. 2,48 μm) e BCF (17,13 vs. 15,70 Hz). Por fim, T5 apresentou a maior redução nos parâmetros cinéticos, com diminuição de VCL (134,43 vs. 86,77 $\mu\text{m}/\text{s}$), VSL (45,22 vs. 22,10 $\mu\text{m}/\text{s}$) e VAP (56,32 vs. 28,27 $\mu\text{m}/\text{s}$), além de redução em ALH (2,92 vs. 1,92 μm), enquanto o BCF se manteve relativamente estável (16,10 vs. 15,29 Hz). De modo geral, o tratamento T4 apresentou o comportamento mais consistente, seguido de T3, mantendo melhores parâmetros cinéticos durante o período de refrigeração. Embora T5 tenha apresentado valores elevados de motilidade inicial, sua redução mais acentuada ao longo do tempo sugere menor estabilidade espermática em concentrações mais elevadas de gema de ovo clarificada. Os resultados indicam melhor manutenção da cinética espermática em concentrações intermediárias (T3 e T4). Os achados são preliminares, devendo ser confirmados com maior número de repetições.

Palavras-chave: Cinética espermática,Refrigeración seminal,Conejo (*Oryctolagus cuniculus*),Yema de huevo Sistema CASA

Autorizações legais: CEUA/UDCA (Comitê Institucional para o Cuidado e Uso de Animais – CICUA): protocolo em tramitação. CEP: não aplicável; ICMBio/IBAMA: não aplicável.

Agradecimentos e financiadores: À equipe da Granja El Remanso, ao Semillero de Investigación ZP3, ao Programa de Zootecnia da UDCA e especialmente à Vicerreitoria de Pesquisa pelo apoio técnico e institucional.

Application of the CASA System (AndroScope®) for the Evaluation of Refrigerated Rabbit Semen with Different Concentrations of Clarified Egg Yolk

**Shirley Andrea Florez Rodriguez¹, Diego Fernando Dubeibe Marin¹,
Yeifer Julian Vargas Parra¹, Luis Antonio Poloche¹**

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales
E-mail: sflorezr@udca.edu.co

The use of computer-assisted semen analysis (CASA) systems, such as AndroScope® (Minitube, Germany), has become a reliable tool for the objective evaluation of sperm quality, allowing precise quantification of kinetic parameters compared to subjective methods. AndroScope® is a portable system based on the same software used in more robust platforms, such as AndroVision®, and is particularly useful for analyzing multiple samples under different experimental conditions, although with lower operational complexity. The aim of this study was to evaluate sperm kinetics of rabbit semen refrigerated at 24 and 48 hours using different concentrations of clarified egg yolk in the extender. Two collections were performed from four healthy adult males, and ejaculates were obtained using an artificial vagina and pooled to minimize individual variation. Semen was adjusted to 35×10^6 spermatozoa per dose and diluted in Tris-citric acid-glucose (TCG) extender containing clarified egg yolk at different concentrations: T1 (0%), T2 (2.5%), T3 (5%), T4 (10%), and T5 (20%). After processing, samples were stored at 5 °C and evaluated at 24 and 48 hours using the AndroScope® system (v.1.1.1.6), with rabbit-specific settings (calibration: 0.55 µm/pixel; depth: 20 µm; area: 10–40 µm). Data were analyzed descriptively, focusing on trends among treatments. A reduction in progressive motility and kinetic parameters was observed over time in all treatments. T1 showed a marked decline (36.46% vs. 12.45%), whereas T2 remained stable (43.07% vs. 42.88%). Slight decreases were observed in T3 (45.37% vs. 41.95%) and T4 (55.76% vs. 53.99%). T5 exhibited the greatest decline (63.04% vs. 29.91%), suggesting lower sperm stability during storage. Regarding circular movement, T1 decreased (23.31% vs. 7.22%), whereas T2, T3, and T4 showed increasing trends over time. In contrast, T5 showed a reduction (43.64% vs. 22.53%). Velocity parameters decreased across all treatments. T1 showed the most pronounced decline in VCL (127.45 vs. 53.78 µm/s), VSL (49.13 vs. 15.52 µm/s), and VAP (58.89 vs. 19.74 µm/s), along with reductions in ALH and BCF. Similar but less pronounced reductions were observed in T2, T3, and T4. T5 also showed substantial decreases in kinetic parameters, although BCF remained relatively stable. Overall, T4 showed the most consistent performance, followed by T3, maintaining better kinetic parameters during refrigeration. Although T5 exhibited high initial motility, its sharper decline over time suggests reduced stability at higher concentrations of clarified egg yolk. These results indicate improved maintenance of sperm kinetics at intermediate concentrations (T3 and T4). The findings are preliminary and should be confirmed with a higher number of replicates.

Keywords: Sperm kinetics, semen refrigeration, rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), egg yolk, CASA system

Legal authorizations: CEUA/UDCA (Institutional Committee for Animal Care and Use – CICUA): protocol under review. CEP: not applicable; ICMBio/IBAMA: not applicable.

Acknowledgments and funders: To the team of Granja El Remanso, the ZP3 Research Group, the Animal Science Program at UDCA, and especially the Vice-Rectorate for Research for technical and institutional support.

Avaliação da cinética espermática por CASA (AndroScope®) e sua relação potencial com a fertilidade em sêmen de coelhos refrigerado

**Shirley Andrea Florez Rodriguez¹, Yeifer Julian Vargas Parra¹,
Luis Antonio Poloche¹, Diego Fernando Dubeibe Marin¹**

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales
E-mail: sflorezr@udca.edu.co

A qualidade espermática isoladamente não é suficiente para prever completamente a fertilidade, sendo os parâmetros relacionados à motilidade, especialmente a proporção de espermatozoides rápidos (RAP), com movimento progressivo (MP) e a velocidade linear progressiva (VSL), considerados indicadores relevantes do potencial fecundante. Uma vez que a análise detalhada da cinética espermática pode fornecer informações mais robustas sobre a funcionalidade dos espermatozoides em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), o objetivo deste estudo foi avaliar a relação entre os parâmetros de cinética espermática, analisados por sistema automatizado CASA (AndroScope®), e o potencial fertilizante do sêmen refrigerado de coelhos submetidos à inseminação artificial (IA). O sêmen foi coletado de 4 machos, homogeneizado em um pool e distribuído em quatro tratamentos experimentais com diferentes níveis de gema de ovo no diluente de TCG: T1 (2,5%), T2 (5%), T3 (10%) e T4 (20%), sendo refrigerado a 5°C durante 24 horas. Para a avaliação da fertilidade, 8 coelhas adultas, clinicamente saudáveis, foram distribuídas equitativamente entre os tratamentos (n=2) e submetidas à inseminação artificial. A receptividade foi determinada por inspeção vulvar, sendo consideradas aptas aquelas com vulva vermelha ou vermelho-violácea. Cada coelha recebeu uma dose inseminante de 0,5 mL, contendo 35×10^6 espermatozoides totais, depositada no fundo do colo uterino por meio de cânula estéril. A ovulação foi induzida por GnRH (0,05 mL) no momento da IA. A taxa de concepção foi determinada por diagnóstico de gestação, sendo posteriormente relacionada aos parâmetros cinéticos espermáticos avaliados por CASA (MP, RAP e VSL). Todos os tratamentos foram utilizados nas inseminações, com 2 fêmeas por tratamento (n=2). Os dados são preliminares, provenientes de uma única coleta de sêmen e de um único evento de inseminação por fêmea. As taxas de concepção variaram entre os tratamentos: T2 e T3 apresentaram 100% de gestação (2/2), enquanto T1 apresentou 50% (1/2) e T4 não resultou em gestação (0/2). A taxa de concepção geral foi de 62,5% (5/8). Os resultados da cinética espermática mostram que o tratamento T4 apresentou o maior valor de motilidade progressiva (62,61%), sendo superior aos tratamentos T1 e T2 ($p < 0,05$), enquanto T3 apresentou valor intermediário (55,43%), sem diferenças significativas. Quanto aos espermatozoides rápidos, T1 apresentou o menor valor (12,59%), diferindo de T3 (21,66%) e T4 (18,65%), que apresentaram os maiores valores ($p < 0,05$), enquanto T2 apresentou comportamento intermediário (16,86%). Para a VSL, T1 apresentou o menor valor (42,96), diferindo de T2 (57,89) e T3 (67,75), que apresentaram os maiores valores ($p < 0,05$), enquanto T4 (45,22) apresentou comportamento intermediário. Na análise da relação com a fertilidade, observou-se que as coelhas gestantes apresentaram maiores valores médios de VSL em comparação às não gestantes ($59,10 \pm 3,83$ vs. $44,16 \pm 2,75$), com correlação positiva moderada ($r = 0,62$). A motilidade progressiva apresentou tendência de associação negativa ($r = -0,27$), enquanto os espermatozoides rápidos apresentaram baixa correlação ($r = 0,17$). Especificamente, os valores médios VSL foram mais elevados nos grupos com gestação positiva, particularmente nos tratamentos T2 e T3. Observou-se que maior motilidade não implicou maior fertilidade, destacando que os parâmetros devem ser interpretados de forma integrada com outras avaliações da qualidade seminal. Os tratamentos com níveis de gema de ovo de 5 e 10% de gema de ovo apresentaram maior VSL e melhor desempenho reprodutivo, enquanto T1 foi menos eficiente e T4 não resultou em gestação. Esses resultados indicam que a VSL pode ser um indicador mais consistente do potencial fertilizante em comparação com a motilidade isolada. No entanto, o reduzido tamanho amostral limita a generalização dos achados.

Palavras-chave: Parâmetros cinéticos, Espermatozoides, qualidade do sêmen, inseminação artificial.

Autorizações legais: CEUA/UDCA (Comitê Institucional para o Cuidado e Uso de Animais – CICUA): protocolo em tramitação. CEP: não aplicável; ICMBio/IBAMA: não aplicável.

Agradecimentos e financiadores: À equipe da Granja El Remanso, ao Semillero de Investigación ZP3, ao Programa de Zootecnia da UDCA e especialmente à Vicerreitoria de Pesquisa pelo apoio técnico e institucional.

Assessment of sperm kinetics by CASA (AndroScope®) and its potential relationship with fertility in refrigerated rabbit semen

**Shirley Andrea Florez Rodriguez¹, Yeifer Julian Vargas Parra¹,
Luis Antonio Poloche¹, Diego Fernando Dubeibe Marin¹**

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales
E-mail: sflorezr@udca.edu.co

Sperm quality alone is not sufficient to fully predict fertility, and motility-related parameters—particularly the proportion of rapid spermatozoa (RAP), progressive motility (PM), and straight-line velocity (VSL)—are considered relevant indicators of fertilizing potential. Since detailed analysis of sperm kinetics can provide more robust information on sperm functionality in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), the aim of this study was to evaluate the relationship between sperm kinetic parameters, assessed using a computerized CASA system (AndroScope®), and the fertilizing potential of refrigerated rabbit semen subjected to artificial insemination (AI). Semen was collected from four males, pooled, and allocated into four experimental treatments with different egg yolk concentrations in a TCG extender: T1 (2.5%), T2 (5%), T3 (10%), and T4 (20%), and stored at 5°C for 24 h. For fertility assessment, eight adult, clinically healthy does were equally distributed among treatments (n = 2) and subjected to artificial insemination. Receptivity was determined by vulvar inspection, and only females with red or reddish-purple vulva were considered receptive. Each doe received a 0.5 mL insemination dose containing 35×10^6 total spermatozoa, deposited in the cervix using a sterile cannula. Ovulation was induced with GnRH (0.05 mL) at the time of AI. Conception rate was determined by pregnancy diagnosis and subsequently related to sperm kinetic parameters evaluated by CASA (PM, RAP, and VSL). All treatments were used for insemination, with two females per treatment (n = 2). The data are preliminary, derived from a single semen collection and a single insemination event per female. Conception rates varied among treatments: T2 and T3 showed 100% pregnancy (2/2), whereas T1 showed 50% (1/2) and T4 resulted in no pregnancies (0/2). The overall conception rate was 62.5% (5/8). Sperm kinetic results showed that T4 had the highest progressive motility (62.61%), significantly higher than T1 and T2 ($p < 0.05$), while T3 showed intermediate values (55.43%) without significant differences. Regarding rapid spermatozoa, T1 had the lowest value (12.59%), differing from T3 (21.66%) and T4 (18.65%), which showed the highest values ($p < 0.05$), while T2 presented intermediate values (16.86%). For VSL, T1 showed the lowest value (42.96), differing from T2 (57.89) and T3 (67.75), which showed the highest values ($p < 0.05$), while T4 (45.22) presented intermediate behavior. In the analysis of the relationship with fertility, pregnant does showed higher mean VSL values compared to non-pregnant does (59.10 ± 3.83 vs. 44.16 ± 2.75), with a moderate positive correlation ($r = 0.62$). Progressive motility showed a negative association trend ($r = -0.27$), while rapid spermatozoa showed low correlation ($r = 0.17$). Specifically, mean VSL values were higher in groups with positive pregnancy outcomes, particularly in treatments T2 and T3. Higher motility did not correspond to higher fertility, highlighting that sperm parameters should be interpreted in an integrated manner with other semen quality assessments. Treatments containing 5% and 10% egg yolk showed higher VSL and better reproductive performance, whereas T1 was less efficient and T4 resulted in no pregnancies. These results indicate that VSL may be a more consistent indicator of fertilizing potential compared to motility alone. However, the small sample size limits the generalization of these findings.

Keywords: Kinetic parameters, Spermatozoa, Semen quality, Artificial insemination

Legal authorizations: CEUA/UDCA (Institutional Committee for the Care and Use of Animals – CICUA): protocol under review. CEP: not applicable; ICMbio/IBAMA: not applicable.

Acknowledgments and funders: The authors thank the staff of El Remanso farm, the ZP3 Research Seedbed, the Animal Science Program at UDCA, and especially the Vice-Rectorate for Research for technical and institutional support.

Efeito de diferentes concentrações de gema de ovo clarificada sobre a motilidade espermática de sêmen refrigerado de conejos (*Oryctolagus cuniculus*)

**Shirley Andrea Florez Rodriguez¹, Yeifer Julian Vargas Parra¹,
Luis Antonio Poloche¹, Diego Fernando Dubeibe Marin¹**

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales
E-mail: sflorezr@udca.edu.co

Embora a gema de ovo seja frequentemente excluída de diluentes para criopreservação de sêmen de *Oryctolagus cuniculus*, alguns estudos relatam seu uso entre 4% e 20%. No entanto, altas concentrações podem comprometer a respiração celular e a motilidade espermática devido à sua composição complexa. Nesse contexto, o plasma da gema de ovo clarificada, rico em lipoproteínas de baixa densidade (LDL), surge como estratégia para isolar componentes funcionais, reduzir interferências e proteger a membrana espermática durante o estresse térmico. Este estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações de gema de ovo clarificada na motilidade espermática de sêmen de coelhos refrigerado a 5 °C. Foram utilizados quatro machos adultos saudáveis da unidade cunícola El Remanso, previamente avaliados por exame andrológico (volume >0,5 mL, concentração >300 × 10⁶ espermatozoides/mL e motilidade >70%). Foram realizadas três coletas por macho com vagina artificial, utilizando-se apenas amostras aptas para formação de um pool seminal, a fim de minimizar o efeito individual. A concentração foi determinada em câmara de Neubauer e ajustada para 35 × 10⁶ espermatozoides por dose. O pool foi dividido em cinco tratamentos: T1 (0%), T2 (2,5%), T3 (5%), T4 (10%) e T5 (20%) de gema de ovo clarificada em diluente Tris-ácido cítrico-glicose (TCG). A gema foi diluída (3:1) e centrifugada a 3.400 × g por 60 min, utilizando-se o sobrenadante rico em LDL. As amostras foram refrigeradas a 5 °C e avaliadas às 24 e 48 h quanto à motilidade total e progressiva em sistema CASA (AndroScope, Minitube). A normalidade foi avaliada por Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias por Levene. Como os dados não apresentaram distribuição normal (p<0,05), aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis (α=0,05). As análises foram realizadas no InfoStat® e os dados expressos como média ± erro padrão. Após 24 horas, a MT% foi superior no T5 (63,04±3,77), sem diferença no T4 e T3 (55,76±1,50 e 45,37±0,79), mas diferente de T1 e T2 (43,51±0,20 e 39,23±0,56) p<0,05, igualmente, a MP% no T5 (62,61±0,74), sem diferença no T4 e T3 (55,43±1,50 e 44,93±0,83); mas diferente do T1 e T2 (42,97±2,50 e 36,46±0,12). Após 48 horas de refrigeração, observou-se redução da motilidade espermática em todos os tratamentos, sendo mais acentuada no tratamento T1, que apresentou os menores valores de motilidade total (13,90%) e motilidade progressiva (12,45%). Em contraste, os tratamentos T2, T3 e T4 mantiveram valores superiores, destacando-se o T4 com a maior motilidade total (54,54%) e progressiva (53,99%), seguido de T2 (43,62% e 42,88%) e T3 (42,62% e 41,95%), enquanto o T5 apresentou valores intermediários (30,72% e 29,91%). Esses resultados sugerem efeito dependente da concentração e do tempo de armazenamento, no qual níveis moderados favorecem maior estabilidade espermática, enquanto concentrações elevadas podem aumentar o estresse oxidativo e comprometer o desempenho celular. A clarificação da gema permite concentrar LDL e reduzir componentes indesejáveis, diminuindo a turbidez do meio e a interferência nas avaliações microscópicas, e favorece a análise em sistemas CASA. Conclui-se que concentrações intermediárias de gema de ovo clarificada favorecem a manutenção da qualidade espermática, enquanto concentrações elevadas podem comprometer o desempenho espermático ao longo do armazenamento. Recomenda-se avaliar períodos mais longos de armazenamento, sua aplicação em criopreservação e a quantificação de espécies reativas de oxigênio para melhor compreensão dos efeitos celulares.

Palavras-chave: Sêmen de coelho, Plasma de gema de ovo, Lipoproteínas de baixa densidade (LDL), qualidade seminal, Refrigeração do sêmen

Autorizações legais: CEUA/UDCA (Comitê Institucional para o Cuidado e Uso de Animais – CICUA): protocolo em tramitação. CEP: não aplicável; ICMbio/IBAMA: não aplicável.

Agradecimentos e financiadores: À equipe da Granja El Remanso, ao Semillero de Investigación ZP3, ao Programa de Zootecnia da UDCA e especialmente à Vicerreitoria de Pesquisa pelo apoio técnico e institucional.

Effect of different concentrations of clarified egg yolk on sperm motility of refrigerated rabbit semen (*Oryctolagus cuniculus*)

**Shirley Andrea Florez Rodriguez¹, Yeifer Julian Vargas Parra¹,
Luis Antonio Poloche¹, Diego Fernando Dubeibe Marin¹**

¹Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales
E-mail: sflorezr@udca.edu.co

Although egg yolk is often excluded from extenders for the cryopreservation of *Oryctolagus cuniculus* semen, some studies report its use at concentrations ranging from 4% to 20%. However, high concentrations may impair cellular respiration and sperm motility due to its complex composition. In this context, clarified egg yolk plasma, rich in low-density lipoproteins (LDL), emerges as a strategy to isolate functional components, reduce interference, and protect the sperm membrane during thermal stress. This study evaluated the effect of different concentrations of clarified egg yolk on sperm motility of rabbit semen stored at 5 °C. Four clinically healthy adult males from the El Remanso rabbit unit were used and previously subjected to andrological evaluation (ejaculate volume >0.5 mL, sperm concentration >300 × 10⁶ spermatozoa/mL, and motility >70%). Three semen collections per male were performed using an artificial vagina, and only samples meeting quality criteria were pooled to minimize individual effects. Sperm concentration was determined using a Neubauer chamber and adjusted to 35 × 10⁶ spermatozoa per dose. The pool was divided into five treatments: T1 (0%), T2 (2.5%), T3 (5%), T4 (10%), and T5 (20%) clarified egg yolk in a Tris–citric acid–glucose (TCG) extender. Egg yolk was diluted (3:1) in bidistilled water and centrifuged at 3,400 × g for 60 min, using the LDL-rich supernatant. Samples were stored at 5 °C and evaluated at 24 and 48 h for total and progressive motility using a CASA system (AndroScope, Minitube). Normality was assessed by Shapiro–Wilk and homogeneity of variances by Levene’s test. As data were not normally distributed (p<0.05), Kruskal–Wallis test was applied (α=0.05). Analyses were performed using InfoStat®, and results were expressed as mean ± standard error. At 24 h, total motility (TM%) was highest in T5 (63.04±3.77), without differences compared to T4 and T3 (55.76±1.50 and 45.37±0.79), but higher than T1 and T2 (43.51±0.20 and 39.23±0.56; p<0.05). Similarly, progressive motility (PM%) was highest in T5 (62.61±0.74), without differences compared to T4 and T3 (55.43±1.50 and 44.93±0.83), but higher than T1 and T2 (42.97±2.50 and 36.46±0.12). After 48 h, sperm motility decreased in all treatments, being more pronounced in T1, which showed the lowest TM (13.90%) and PM (12.45%). In contrast, T2, T3, and T4 maintained higher values, with T4 showing the highest TM (54.54%) and PM (53.99%), followed by T2 (43.62% and 42.88%) and T3 (42.62% and 41.95%), while T5 showed intermediate values (30.72% and 29.91%). These results suggest a concentration- and time-dependent effect, where moderate levels improve sperm stability, whereas higher concentrations may increase oxidative stress and impair cellular performance. Egg yolk clarification concentrates LDL and reduces undesirable components, decreasing medium turbidity and interference in microscopic evaluations, thereby improving CASA-based analysis. It is concluded that intermediate concentrations of clarified egg yolk improve sperm quality preservation, whereas higher concentrations may negatively affect sperm performance over storage time. Further studies should evaluate longer storage periods, its application in cryopreservation, and the quantification of reactive oxygen species to better understand cellular effects.

Keywords: Rabbit semen, Egg yolk plasma, Low-density lipoproteins (LDL), Semen quality, Semen refrigeration

Legal authorizations: CEUA/UDCA (Institutional Committee for the Care and Use of Animals – CICUA): protocol under review. CEP: not applicable; ICMbio/IBAMA: not applicable.

Acknowledgments and funders: The authors thank the staff of El Remanso farm, the ZP3 Research Seedbed, the Animal Science Program at UDCA, and especially the Vice-Rectorate for Research for technical and institutional support.

Morfologia espermática como sentinela da saúde reprodutiva em camundongos: uma abordagem preditiva no envelhecimento

Larissa Araújo Stábile¹, Carlos Alonso Paco Nagaki¹, Elis Helena Correa dos Santos¹, Mariana Karla Francolino da Silva^{2,3}, Marcio Gonçalves de Paula Junior¹, Leticia Souza Cotrin¹, Nelson Munhoz Neto¹, Thais Rose dos Santos Hamilton⁴, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹

¹Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ³VetSêmen, ⁴Universidade Estadual Paulista
E-mail: lastabile@usp.br

A morfologia espermática é um dos indicadores mais sensíveis da integridade do sistema reprodutor masculino, atuando como um reflexo direto da eficiência da espermiogênese testicular e da maturação epididimária. Apesar de sua importância diagnóstica, ela é frequentemente subutilizada devido à carência de referenciais padronizados e à dificuldade em correlacionar padrões morfológicos a etiologias específicas em animais de laboratório. O envelhecimento, como processo de ruptura da homeostase, oferece o cenário ideal para demonstrar o potencial da análise morfológica refinada. Ao decifrar a "assinatura" das alterações causadas pela idade, é possível transformar a observação visual em uma ferramenta preditiva capaz de direcionar diagnósticos e avaliar o impacto de intervenções terapêuticas de forma precisa. Com isso, a hipótese deste estudo é que o envelhecimento reprodutivo em camundongos manifesta-se por meio de um padrão estruturado de falhas morfológicas, em vez de um acúmulo aleatório de defeitos, havendo uma assinatura específica que permita a distinção acurada entre animais jovens e senescentes, independentemente da variabilidade individual. O objetivo foi desenvolver um modelo preditivo baseado em análise multivariada para validar a morfologia espermática como um indicador de precisão da senescência, quantificando o peso de variáveis determinantes na identificação do status reprodutivo. Foram analisados dados retrospectivos de 83 camundongos (C57Bl6/J) jovens (4 meses; n= 38) e senis (24 meses; n= 45), eutanasiados por deslocamento cervical para preservação da integridade seminal. A avaliação incluiu 17 parâmetros de morfologia (defeitos individuais, regionais e multidefeitos). Após seleção de variáveis por testes univariados ($p < 0,05$, FDR) e controle de multicolinearidade (Spearman $r > 0,80$), utilizou-se Regressão Logística com Penalização de Firth, método recomendado para dados com separação completa e variáveis esparsas. O desempenho foi avaliado por AUC e validação LOOCV (R v.4.4.1). A análise univariada revelou que o envelhecimento promove um impacto multifocal na morfologia espermática. Animais senis apresentaram um aumento significativo na mediana da porcentagem de defeitos individuais (64,4% vs. 44,5%; $p < 0,001$) e de multidefeitos (3,6% vs. 1%; $p < 0,001$). Entre as anomalias específicas, destacaram-se os aumentos em defeitos de cabeça (31,4% vs. 20,5%; $p < 0,001$), espermatozoides decapitados (mediana 3 vs. 1; $p = 0,015$), gancho reduzido (mediana 4 vs. 0; $p = 0,002$) e cauda quebrada (mediana 1 vs. 0; $p = 0,037$). O modelo preditivo final, baseado na porcentagem de defeitos individuais, alcançou capacidade discriminativa excepcional (AUC= 0,929), com alta estabilidade sob validação cruzada leave-one-out (AUC_{LOOCV}= 0,943), confirmando que a morfologia espermática constitui um preditor robusto do estado reprodutivo associado à idade. Portanto, o estudo reafirma a importância da análise morfológica na andrologia animal, elevando-a de uma etapa descritiva para uma possível ferramenta de diagnóstico reprodutivo. Ao demonstrar que alterações específicas na morfologia espermática são capazes de prever a senescência com alta precisão, estabelece-se um novo paradigma: a morfologia como uma "régua" de integridade reprodutiva. Para a ciência de animais de laboratório, essa análise refinada atua como uma ferramenta de triagem inicial, permitindo identificar a etiologia das falhas reprodutivas e discernir quais etapas da espermatogênese foram afetadas pela intervenção experimental, tornando esta ferramenta essencial para o avanço da saúde reprodutiva nesses animais que são utilizados como modelos para humanos.

Palavras-chave: animais de laboratório, alterações morfológicas, envelhecimento, análise retrospectiva, modelo preditivo.

Autorizações legais: CEUA/FMVZ-USP: 3336011221, 7125160518 e 3406121124.

Agradecimentos e financiadores: A Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo (FAPESP; 24/23080; 21/11747-6) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 404759/2025-4).

Sperm morphology as a sentinel of reproductive health in mice: a predictive approach to aging

Larissa Araújo Stábile¹, Carlos Alonso Paco Nagaki¹, Elis Helena Correa dos Santos¹, Mariana Karla Francolino da Silva^{2,3}, Marcio Gonçalves de Paula Junior¹, Leticia Souza Cotrin¹, Nelson Munhoz Neto¹, Thais Rose dos Santos Hamilton⁴, Camilla Mota Mendes¹, Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção¹

¹Universidade de São Paulo, ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ³VetSêmen, ⁴Universidade Estadual Paulista
E-mail: lastabile@usp.br

Sperm morphology is one of the most sensitive indicators of the integrity of the male reproductive system, acting as a direct reflection of testicular spermiogenesis and epididymal maturation efficiency. Despite its diagnostic importance, it is often underutilized due to the lack of standardized references and the difficulty in correlating morphological patterns with specific etiologies in laboratory animals. Aging, as a process of disrupted homeostasis, provides an ideal scenario to demonstrate the potential of refined morphological analysis. Deciphering the “signature” of age-related alterations enables the transformation of visual observations into predictive tools capable of guiding diagnoses and accurately assessing the impact of therapeutic interventions. Thus, this study hypothesizes that reproductive aging in mice manifests as a structured pattern of morphological defects rather than a random accumulation of abnormalities, with a specific signature that allows accurate distinction between young and senescent animals, regardless of individual variability. The objective was to develop a predictive model based on multivariate analysis to validate sperm morphology as a precise indicator of senescence, while quantifying the contribution of key variables in determining reproductive status. Retrospective data from 83 mice (C57Bl6/J) were analyzed, including young (4 months; n= 38) and senescent (24 months; n= 45) animals, euthanized by cervical dislocation to preserve seminal integrity. The evaluation included 17 morphological parameters (individual defects, regional defects, and multiple defects). After variable selection using univariate tests ($p < 0.05$, FDR) and multicollinearity control (Spearman $r > 0.80$), Firth penalized logistic regression was applied, as a method recommended for data with complete separation and sparse variables. Performance was assessed using AUC and LOOCV validation (R v.4.4.1). Univariate analysis revealed that aging promotes a multifocal impact on sperm morphology. Senescent animals showed a significant increase in the median percentage of individual defects (64.4% vs. 44.5%; $p < 0.001$) and multiple defects (3.6% vs. 1%; $p < 0.001$). Among specific abnormalities, notable increases were observed in head defects (31.4% vs. 20.5%; $p < 0.001$), decapitated sperm cells (median 3 vs. 1; $p = 0.015$), reduced hook (median 4 vs. 0; $p = 0.002$), and broken tail (median 1 vs. 0; $p = 0.037$). The final predictive model, based on the percentage of individual defects, achieved exceptional discriminative capacity (AUC= 0.929), with high stability under leave-one-out cross-validation (AUC_LOOCV= 0.943), confirming that sperm morphology constitutes a robust predictor of age-associated reproductive status. Therefore, this study reaffirms the importance of morphological analysis in animal andrology, elevating it from a descriptive step to a potential reproductive diagnostic tool. By demonstrating that specific alterations in sperm morphology can predict senescence with high accuracy, a new paradigm is established: morphology as a “ruler” of reproductive integrity. For laboratory animal science, this refined analysis serves as an initial screening tool, enabling the identification of the etiology of reproductive failures and determining which stages of spermatogenesis were affected by experimental interventions, making it an essential tool for advancing reproductive health in animals used as models for humans.

Keywords: laboratory animals, morphologic alterations, aging, retrospective analysis, predictive model

Legal authorizations: CEUA/FMVZ-USP: 3336011221, 7125160518 and 3406121124

Acknowledgments and funders: The São Paulo Research Foundation (FAPESP; 24/23080; 21/11747-6) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; 404759/2025-4).