

Comparação entre a criopreservação de espermatozoides isolados e a vitrificação da cauda do epidídimo em preás, *Galea spixii* (Wagler, 1831)

Alexandre Rodrigues Silva¹, Pedro Augusto Pinheiro Brito¹, Euziele Oliveira de Santana¹, Lilian Leal Dantas¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Gabriela Linhares Leite¹, Isadora Gomes Guerra¹, Andreia Maria Silva¹, Moacir Franco de Oliveira¹, Carlos Eduardo Bezerra de Moura¹

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido
E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

Os preás (*Galea spixii*) são importantes engenheiros ambientais cuja reprodução natural tem sido impactada pela fragmentação do bioma Caatinga. Assim, a preservação de espermatozoides epididimários surge como opção para sua conservação, principalmente em indivíduos que venham subitamente a óbito. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da criopreservação de espermatozoides epididimários isolados com aqueles inclusos na cauda epididimária vitrificada. O trabalho foi submetido/aprovado pelo CEUA/UFERSA (n°33/2024) e SISBIO (n°6618-5). Foram utilizados epidídimos de 5 animais adultos do criatório científicos da UFERSA, dos quais foram recuperadas as caudas epididimárias destinadas a dois grupos: no Grupo 1 (G1), os espermatozoides foram coletados por lavagem retrógrada e criopreservados isoladamente em Tris-Gema à 10% e 12% de glicerol, armazenados em nitrogênio, posteriormente reaquescidos e analisados. No Grupo 2 (G2), procedeu-se vitrificação da cauda epididimária por completo em solução de equilíbrio, seguida de exposição a solução vitrificante com 2,5 mL de Meio Eagle Modificado de Dulbecco, 0,25M de sacarose (SAC), 10% de soro fetal bovino e 40% de etilenoglicol por 2 minutos. As amostras foram acondicionadas em dispositivos metálicos, armazenados em nitrogênio, reaquescidas e removendo-se os crioprotetores em soluções de SAC (5M, 2,5M e 0M). Após reaquescimento, procedeu-se a recuperação de espermatozoides por flutuação. Para ambos os grupos, os espermatozoides foram avaliados quanto aos parâmetros cinéticos por sistema computadorizado (CASA), a morfologia em esfregaços úmidos, a integridade funcional de membrana pelo teste hiposmótico, e a viabilidade e capacidade de ligação por microscopia de epifluorescência; ademais, fragmentos do tecido fresco e vitrificado foram fixados em Bouin e processados para histologia, sendo avaliados quanto a ruptura do epitélio, retração da membrana basal e conteúdo luminal, em escores de 1 a 3, sendo 3 o melhor. Os resultados foram expressos em média \pm erro-padrão e comparados por ANOVA seguida do teste t de Student ($P < 0,05$). Quanto aos parâmetros cinéticos, o grupo de espermatozoides isolados (G1) apresentou valores médios de $33,2 \pm 4,5\%$ para motilidade total, $2,00 \pm 0,6\%$ para motilidade progressiva, $7,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$ para amplitude lateral de cabeça (ALH), $8,2 \pm 2,4\%$ para população rápida e $25,2 \pm 2,6\%$ para população média. Já o grupo com espermatozoides inclusos na cauda (G2) apresentou valores significativamente menores ($P < 0,05$): $0,2 \pm 0,2\%$, $0,0 \pm 0,0\%$, $1,9 \pm 1,9 \mu\text{m}$, $0,0 \pm 0,0\%$, $0,2 \pm 0,2\%$, respectivamente. No tocante à morfologia e à capacidade de ligação dos espermatozoides, os grupos foram similares ($P > 0,05$), com valores de $85,8 \pm 3,4\%$ normais e um n° de 84 espermatozoides ligados para o G1, e $81,8 \pm 4,5\%$ e um n° de 23 espermatozoides ligados para o G2. A viabilidade e a integridade funcional de membrana foram melhores preservadas ($P < 0,05$) quando os espermatozoides epididimários foram criopreservados isolados ($80,2 \pm 4,9\%$ e $13,8 \pm 4,4\%$) do que quando inclusos na cauda do epidídimo ($61,8 \pm 2,9\%$ e $0,5 \pm 0,3\%$). Na análise histológica do tecido epididimário, o fresco apresentou escores de $2,93 \pm 0,01$ para integridade do epitélio, $2,89 \pm 0,02$ para a membrana basal, e $2,94 \pm 0,01$ para conteúdo coeso. No G2, o tecido sofreu significativa queda de qualidade ($P < 0,05$), apresentando escores de $1,63 \pm 0,03$ na integridade epitelial, $1,77 \pm 0,03$ para retração de membrana, e $1,47 \pm 0,03$ na coesão do conteúdo luminal. De fato, o tecido criopreservado apresentou epitélio com injúrias e conteúdo luminal não coeso, o que pode ter resultado na baixa capacidade de preservação espermática obtida por essa metodologia. Em conclusão, a criopreservação de espermatozoides inclusos (G2) leva a perda significativa na qualidade tecidual e espermática, sendo sugestivo o uso da criopreservação de espermatozoides epididimários isolados como ferramenta para formação de biobancos em *G. spixii*.

Palavras-chave: Crioprotetores, Germoplasma, Roedores, Biobancos, *Caviidae*

Autorizações legais: O experimento foi aprovado pelo CEUA/UFERSA (n°33/2024) e SISBIO (n°6618-5).

Agradecimentos e financiadores: Agradecimento a CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro e ao incentivo a pesquisa

Comparison between the cryopreservation of isolated spermatozoa and the vitrification of the epididymal tail of *Galea spixii* (Wagler, 1831)

Alexandre Rodrigues Silva¹, Pedro Augusto Pinheiro Brito¹, Euziele Oliveira de Santana¹, Lilian Leal Dantas¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Gabriela Linhares Leite¹, Isadora Gomes Guerra¹, Andreia Maria Silva¹, Moacir Franco de Oliveira¹, Carlos Eduardo Bezerra de Moura¹

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido
E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

The cavies (*Galea spixii*) are important environmental engineers whose natural reproduction has been affected by the fragmentation of the Caatinga biome. Thus, the preservation of epididymal spermatozoa emerges a potential strategy for their conservation, particularly in individuals that die unexpectedly. In this context, the objective of this study was to compare the effect of cryopreservation of isolated epididymal spermatozoa with those enclosed within the vitrified epididymal tail. The study was submitted to and approved by CEUA/UFERSA (No.33/2024) and SISBIO (No.6618-5). Epididymides from 5 adult animals from the scientific breeding colony of UFERSA were used, from which the epididymal tails were recovered and allocated into two groups. In Group 1 (G1), spermatozoa were collected by retrograde flushing and cryopreserved individually in Tris-egg yolk extender containing 10% and 12% glycerol, stored in liquid nitrogen, subsequently rewarmed, and analyzed. In Group 2 (G2), the entire epididymal tail was vitrified in an equilibration solution, followed by exposure to a vitrification solution containing 2.5 mL of Dulbecco's Modified Eagle Medium, 0.25 M sucrose (SUC), 10% fetal bovine serum, and 40% ethylene glycol for 2 minutes. The samples were placed in metallic devices, stored in liquid nitrogen, rewarmed, and the cryoprotectants were removed using SUC solutions (5 M, 2.5 M, and 0 M). After warming, spermatozoa were recovered by flotation. For both groups, spermatozoa were evaluated for kinetic parameters using a computer-assisted system (CASA), morphology in wet smears, functional membrane integrity using the hypoosmotic swelling test, and viability and binding capacity by epifluorescence microscopy. In addition, fragments of fresh and vitrified tissue were fixed in Bouin's solution and processed for histology, being evaluated for epithelial rupture, basal membrane retraction, and luminal content, using scores from 1 to 3, where 3 represented the best condition. The results were expressed as mean \pm standard error and compared by ANOVA followed by Student's *t* test ($P < 0.05$). Regarding kinetic parameters, the isolated spermatozoa group (G1) showed mean values of $33.2 \pm 4.5\%$ for total motility, $2.00 \pm 0.6\%$ for progressive motility, $7.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ for amplitude of lateral head displacement (ALH), $8.2 \pm 2.4\%$ for the rapid population, and $25.2 \pm 2.6\%$ for the medium population. In contrast, the group with spermatozoa enclosed within the epididymal tail (G2) showed significantly lower values ($P < 0.05$): $0.2 \pm 0.2\%$, $0.0 \pm 0.0\%$, $1.9 \pm 1.9 \mu\text{m}$, $0.0 \pm 0.0\%$, and $0.2 \pm 0.2\%$, respectively. Regarding sperm morphology and binding capacity, the groups were similar ($P > 0.05$), with values of $85.8 \pm 3.4\%$ normal spermatozoa and 84 bound spermatozoa in G1, and $81.8 \pm 4.5\%$ normal spermatozoa and 23 bound spermatozoa in G2. Viability and functional membrane integrity were better preserved ($P < 0.05$) when epididymal spermatozoa were cryopreserved in isolation ($80.2 \pm 4.9\%$ and $13.8 \pm 4.4\%$) than when enclosed within the epididymal tail ($61.8 \pm 2.9\%$ and $0.5 \pm 0.3\%$). In the histological analysis of epididymal tissue, fresh samples presented scores of 2.93 ± 0.01 for epithelial integrity, 2.89 ± 0.02 for the basal membrane, and 2.94 ± 0.01 for cohesive luminal content. In G2, the tissue showed a significant decline in quality ($P < 0.05$), with scores of 1.63 ± 0.03 for epithelial integrity, 1.77 ± 0.03 for membrane retraction, and 1.47 ± 0.03 for luminal content cohesion. Indeed, the cryopreserved tissue exhibited epithelial injury and non-cohesive luminal content, which may have contributed to the low sperm preservation capacity observed with this methodology. In conclusion, the cryopreservation of spermatozoa enclosed within the epididymal tail (G2) leads to a significant loss of both tissue and sperm quality. Therefore, the cryopreservation of isolated epididymal spermatozoa is suggested as a more suitable approach for the establishment of biobanks in *G. spixii*.

Keywords: Cryoprotectants, Germplasm, Rodents, Biobank, Caviidae

Legal authorizations: The study was submitted to and approved by CEUA/UFERSA (No.33/2024) and SISBIO (No.6618-5).

Acknowledgments and funders: CAPES and CNPq for financial support and for encouraging scientific research

Investigação da neurotransmissão simpática na contração *in vitro* da cauda do epidídimo e ducto deferente de cutia (*Dasyprocta leporina*)

Lorie Tukamoto Fernandes¹, Luiz Ricardo de Almeida Kiguti¹,
José Heitzmann Fontenelle^{1,2}, Cristina de Fátima Lucio¹

¹Universidade Metropolitana de Santos, ²Orquidário Municipal de Santos
E-mail: lorietukamoto@gmail.com

Em mamíferos, o sistema nervoso autônomo simpático é responsável pela contração de musculatura lisa do ducto deferente e epidídimo para o transporte do espermatozoide. Esse processo é mediado pela liberação de noradrenalina (NA) e trifosfato de adenosina (ATP). A ejaculação nas cutias (*Dasyprocta leporina*) acontece da mesma forma que em outros mamíferos, contudo, não existe, até o momento, um estudo que confirme a atuação do sistema nervoso simpático e a ação da NA e do ATP, no processo ejaculatório nessa espécie. O presente estudo teve como objetivo identificar o papel do ATP e da NA na contração *in vitro* da cauda do epidídimo (CE) e do ducto deferente (DD) de cutias. Foram selecionadas 7 cutias machos, provenientes do plantel do Orquidário Municipal de Santos, submetidas à orquiectomia para controle reprodutivo. Após a remoção dos testículos, epidídimos e ductos deferentes direito e esquerdo, os tecidos foram imersos em solução de Krebs a 4°C, transportados sob refrigeração e analisados em até 4 horas após a coleta. No laboratório, a CE e o DD foram isolados e o lúmen lavado com solução de Krebs. Em seguida, os tecidos foram seccionados transversalmente em segmentos de 1,5cm (12 segmentos). As extremidades dos segmentos, tanto do DD, quanto da CE, foram fixadas com fio de algodão, acondicionadas em câmaras musculares e conectadas a um transdutor para mensuração da tensão. Os tecidos foram mantidos sob tensão basal de 10mN, em uma câmara muscular preenchida com 10ml de solução de Krebs, a 37°C, aerados com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% de CO₂). Antes do início de cada teste os tecidos foram mantidos na câmara por 30 minutos para estabilização. A viabilidade tecidual (capacidade contrátil) foi avaliada pela indução da contração com cloreto de potássio 80mM. Os tecidos viáveis foram lavados com solução de Krebs e mantidos em repouso de 30 minutos antes do início do teste. Curvas concentração-resposta (CCR) à NA (1nM–1mM) ou ATP (10nM–1mM) foram construídas em escala logarítmica pela adição cumulativa dos agonistas às cubas em intervalos de 2 minutos entre as aplicações sucessivas dos agonistas. Os dados referentes às contrações obtidas dos tecidos durante os testes foram registrados pelo PowerLab System® (ADInstruments Inc., Sydney, Austrália). Os dados foram analisados por teste t de student, análise de variância e teste de Tukey para comparações múltiplas, considerando p<0,05. A NA exógena induziu contrações de maneira concentração-dependente tanto na CE, quanto no DD. As contrações induzidas pela NA no DD e CE foram de comportamento fásico, atingindo tensão máxima em aproximadamente 5 segundos e retornando a linha basal. Na CE, foi observada contração a partir da concentração de 10µM de NA exógena, enquanto no DD a primeira contração foi observada a partir de 1µM. Na CE, a NA induziu contração de tensão máxima de 42,98 ± 3.16 mN, com concentração 12µM induzindo 50% da contração máxima. No DD, a NA induziu contração de tensão máxima de 126 ± 3.22mN, com concentração 4,86µM induzindo 50% da contração máxima. No DD e CE, o ATP exógeno induziu contrações de maneira concentração-dependente, com comportamento fásico, sendo identificado o máximo de tensão em aproximadamente 4 segundos, seguido do retorno para a linha basal. Na adição do ATP exógeno, a contração foi observada a partir da concentração cumulativa aplicada de 100nM na CE e 1µM no DD. Na CE, o ATP exógeno induziu contração de tensão máxima de 8,12 ± 1,20mN, sendo identificado na concentração 2µM a indução de 50% da contração máxima. O DD foi menos sensível que a CE às contrações induzidas pelo ATP, visto que não foi observada saturação da CCR até a concentração máxima utilizada do agonista (1mM). Na concentração de 1mM a tensão máxima induzida pelo ATP no DD foi de cerca de 40mN. Esses resultados demonstram, pela primeira vez, que o ATP e a NA promovem contração *in vitro* no DD e na CE de cutias, sugerindo participação de ambos no processo de emissão desta espécie.

Palavras-chave: ejaculação, noradrenalina, adenosina trifosfato, câmara muscular, cutia

Autorizações legais: CEUA/UNIMES: n. protocolo 20223092018M; SISBIO: n. protocolo 91451-1.

Investigation of sympathetic neurotransmission during in vitro contraction of the epididymal tail and vas deferens in agouti (*Dasyprocta leporina*)

**Lorie Tukamoto Fernandes¹, Luiz Ricardo de Almeida Kiguti¹,
José Heitzmann Fontenelle^{1,2}, Cristina de Fátima Lucio¹**

¹Universidade Metropolitana de Santos, ²Orquidário Municipal de Santos
E-mail: lorietukamoto@gmail.com

In mammals, the sympathetic autonomic nervous system is responsible for the contraction of smooth muscle in the vas deferens and epididymis, enabling sperm transport. This process is mediated by the release of noradrenaline (NA) and adenosine triphosphate (ATP). Ejaculation in agouti (*Dasyprocta leporina*) occurs similarly to other mammals; however, to date, no study has confirmed the role of the sympathetic nervous system and the action of NA and ATP in the ejaculatory process in this species. The present study aimed to identify the role of ATP and NA in the in vitro contraction of the epididymal tail (ET) and vas deferens (VD) of agouti. Seven male agoutis were selected from the Orquidário Municipal de Santos colony and were subjected to orchietomy for reproductive control. Testes, epididymides, and VD were bilaterally removed. Tissues were immersed in Krebs solution at 4°C, transported under refrigeration, and analyzed within 4 hours after collection. In the laboratory, the ET and VD were isolated and their lumens washed with Krebs solution. The tissues were then sectioned into 1.5 cm segments. The ends of both VD and ET segments were fixed with cotton thread, placed in organ baths, and connected to a transducer to measure tension. Tissues were maintained under a basal tension of 10 mN in an organ bath containing 10 mL of Krebs solution at 37°C, aerated with a carbogenic mixture (95% O₂ and 5% CO₂). Before each test, tissues were allowed to stabilize for 30 minutes. Tissue viability was assessed by inducing contraction with 80 mM potassium chloride. Viable tissues were washed with Krebs solution and allowed to rest for 30 minutes before testing. Concentration-response curves (CRC) to NA (1 nM–1 mM) or ATP (10 nM–1 mM) were constructed by cumulative addition of agonists at 2-minute intervals. Contractile responses were recorded using the PowerLab System® (ADInstruments Inc., Sydney, Australia). Data were analyzed using Student's t-test, analysis of variance (ANOVA), and Tukey's test for multiple comparisons, considering $p < 0.05$. Exogenous NA induced concentration-dependent contractions in both ET and VD. These contractions were phasic, reaching maximum tension in approximately 5 seconds and returning to baseline. In the ET, contraction was observed from 10 μM NA, whereas in the VD it began at 1 μM. In the ET, NA induced a maximum tension of 42.98 ± 3.16 mN, with 12 μM producing 50% of maximal contraction. In the VD, maximum tension reached 126 ± 3.22 mN, with 4.86 μM producing 50% of maximal contraction. In both VD and ET, exogenous ATP induced concentration-dependent phasic contractions, with peak tension at approximately 4 seconds followed by a return to baseline. ATP-induced contraction began at 100 nM in the ET and 1 μM in the VD. In the ET, ATP induced a maximum tension of 8.12 ± 1.20 mN, with 2 μM producing 50% of maximal contraction. The VD was less sensitive to ATP, as no saturation of the CRC was observed up to the maximum concentration tested (1 mM). At 1 mM, ATP induced a maximum tension of approximately 40 mN in the VD. These results demonstrate, for the first time, that ATP and NA induce contraction of the vas deferens and epididymal tail in agouti, suggesting that both participate in the emission phase of the ejaculatory reflex in this species.

Keywords: ejaculation, noradrenaline, adenosine triphosphate, organ bath, agouti

Legal authorizations: CEUA/UNIMES: protocol number 20223092018M; SISBIO: protocol number 91451-1.

Resultados Preliminares: Colheita Farmacológica e Criopreservação de Sêmen de Ursos-Andinos (*Tremarctos ornatus*)

Aléxia Pimenta Bom Conselho^{1,2}, Karla Noemí Alfaro Flores³, Brenda Carolina Peralta Rivera⁴, Virginia Rivadeneira³, Víctor Hugo Cornelio Díaz³, Pedro Nacib Jorge-Neto^{2,1}, Cristiane Schilbach Pizzutto^{5,1,2}, Rocío Sílvia Sandoval Monzón³, Alexei Vicent Santiani Acosta³, David Javier Galindo Huamán³

¹Universidade de São Paulo, ²Instituto Reprocon, ³Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ⁴Universidad Científica del Sur, ⁵Instituto Butantan
E-mail: alexiapbc@gmail.com

O urso-andino (*Tremarctos ornatus*) é uma espécie emblemática da América do Sul, com ocorrência registrada no Peru, Bolívia, Venezuela, Colômbia e Equador. Além de desempenhar um papel ecológico fundamental na manutenção dos ecossistemas andinos, a espécie possui importante valor cultural para as populações locais. Classificado como vulnerável pela IUCN, a espécie é ameaçada principalmente pela perda e fragmentação de habitat, fatores que impactam a viabilidade populacional e consequente redução da diversidade genética. Nesse contexto, a integração de biotecnologias reprodutivas e iniciativas de biobancos constitui uma estratégia promissora para fortalecer sua conservação, permitindo o armazenamento de material genético e a futura aplicação em programas de manejo reprodutivo *ex situ* e *in situ*. Este estudo objetivou realizar a colheita farmacológica de sêmen em ursos-andinos, avaliar parâmetros seminais a fresco e pós-descongelamento com os diluentes OptiXcell e Optidyl, e gerar subsídios para a implementação de biotécnicas reprodutivas em machos da espécie. Dois espécimes mantidos sob cuidados humanos no Parque Zoológico de Las Leyendas, Sede Huachipa (Lima, Peru), participaram do estudo: Anku (15 anos; 195,5 kg) e Puky (26 anos; 151,5 kg). Os procedimentos foram realizados em outubro de 2025, utilizando-se o protocolo anestésico de cetamina (4 mg/kg) associada ao agonista α_2 -adrenérgico medetomidina (0,07 mg/kg), com manutenção por via inalatória (isoflurano). A colheita seminal foi realizada por via uretral, utilizando-se do osso peniano como referência para a exposição do pênis, seguida de higienização com solução fisiológica e gaze estéril. Posteriormente, uma sonda uretral n° 8 foi introduzida e a próstata foi estimulada manualmente com o auxílio de uma probe para pequenos ruminantes. O sêmen foi imediatamente diluído em OptiXcell e Optidyl e avaliado por sistema computadorizado de análise seminal (CASA) portátil AndroScope (Minitube). As amostras foram acondicionadas em microtubos e submetidas ao resfriamento em caixa térmica de 5 L contendo água a 37 °C e quatro blocos de gelo reciclável por aproximadamente 1 h até o transporte ao laboratório, permanecendo sob refrigeração até completar 4 h de equilíbrio, com taxa de resfriamento aproximada de 0,13 °C/min. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL e criopreservado em vapor de nitrogênio, a 5 cm de distância da superfície da fase líquida, por 15 minutos, seguido de imersão definitiva em nitrogênio líquido (-196 °C). Para a avaliação pós-descongelamento, as amostras foram submetidas a banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Para o espécime Anku, a concentração espermática foi de $8552,27 \times 10^6/\text{mL}$. Com o diluente OptiXcell (diluição 1:40), observaram-se, respectivamente, a fresco e pós-descongelamento, motilidade total (MT) de 66,42% e 9,29%, e motilidade progressiva (MP) de 58,29% e 6,24%. Com o diluente Optidyl (1:20), obtiveram-se MT de 99,64% e 14,17%, e MP de 98,32% e 10,71% (a fresco e pós-descongelamento, respectivamente). No espécime Puky, a concentração espermática foi de $2705,31 \times 10^6/\text{mL}$. Utilizando o diluente OptiXcell (1:40), registraram-se MT de 75,04% e 34,31%, e MP de 66,61% e 30,98% (a fresco e pós-descongelamento). Com o diluente Optidyl (1:30), os valores foram de 86,36% e 17,9% para MT, e 79,2% e 11,61% para MP. Os resultados demonstram que a colheita farmacológica de sêmen é viável para *T. ornatus*, com potencial para incorporação em manejos anuais e formação de bancos de germoplasma. Foram observadas altas concentrações espermáticas e adequada motilidade inicial; no entanto, a redução acentuada pós-descongelamento indica danos celulares associados à criopreservação. A avaliação pelo AndroScope requer diluições precisas (1:30 a 1:40) para evitar a sobreposição celular. Os dados indicam a necessidade de ampliar o delineamento amostral e otimizar os protocolos de resfriamento e congelamento, bem como testar a eficiência de outros diluidores para a espécie.

Palavras-chave: Ursidae, biotecnologias reprodutivas, conservação, germoplasma, biobanco.

Autorizações legais: Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) sob o número de registro RD N°D000044-2025-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS. Lima, Peru.

Agradecimentos e financiadores: Agradecemos à equipe PATPAL - Huachipa pelo apoio e parceria. Esta pesquisa foi financiada pela Universidade Nacional de San Marcos (RR N° 005446-2025-R-UNMSM), projeto A25081081 – PCONFIGI 2025.

Preliminary Results: Pharmacological Semen Collection and Cryopreservation in Andean Bears (*Tremarctos ornatus*)

Aléxia Pimenta Bom Conselho^{1,2}, Karla Noemí Alfaro Flores³, Brenda Carolina Peralta Rivera⁴, Virginia Rivadeneira³, Víctor Hugo Cornelio Díaz³, Pedro Nacib Jorge-Neto^{2,1}, Cristiane Schilbach Pizzutto^{5,1,2}, Rocío Sílvia Sandoval Monzón³, Alexei Vicent Santiani Acosta³, David Javier Galindo Huamán³

¹Universidade de São Paulo, ²Instituto Reprocon, ³Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ⁴Universidad Científica del Sur, ⁵Instituto Butantan
E-mail: alexiapbc@gmail.com

The Andean bear (*Tremarctos ornatus*) is an emblematic species of South America, occurring in Peru, Bolivia, Venezuela, Colombia, and Ecuador. Besides playing a fundamental ecological role in maintaining Andean ecosystems, it holds significant cultural value for local populations. Classified as vulnerable by the IUCN, the species is primarily threatened by habitat loss and fragmentation, factors that impact population viability and contribute to the reduction of genetic diversity. In this context, the integration of reproductive biotechnologies and biobanking initiatives constitutes a promising strategy to strengthen its conservation, allowing for the storage of genetic material and future application in *ex situ* and *in situ* reproductive management programs. This study aimed to perform pharmacological semen collection in Andean bears, evaluate fresh and post-thaw seminal parameters using OptiXcell and Optidyl extenders, and generate data for the implementation of reproductive biotechniques in males of the species. Two Andean bears kept under human care at the Las Leyendas Zoological Park, Huachipa Site (Lima, Peru), participated in the study: Anku (15 years old; 195.5 kg) and Puky (26 years old; 151.5 kg). Procedures were performed in October 2025, using ketamine (4 mg/kg) associated with the α 2-adrenergic agonist medetomidine (0.07 mg/kg), with anesthetic maintenance via isoflurane. Seminal collection was performed via the urethral route, using the os penis as a reference for penis exposure, followed by hygiene with physiological saline and sterile gauze. Subsequently, a No. 8 urethral probe was introduced, and the prostate was manually stimulated with the aid of a probe designed for small ruminants. The semen was immediately diluted in OptiXcell and Optidyl and evaluated by a portable AndroScope Computer-Aided Semen Analysis (CASA) system (Minitube). The semen was placed in microtubes and subjected to cooling in a 5 L thermal box containing water at 37°C and four recyclable ice blocks for approximately 1 hour until arrival at the laboratory, remaining refrigerated until completing 4 hours, with an approximate cooling rate of 0.13°C/min. Next, the semen was packaged in 0.25 mL straws and cryopreserved in nitrogen vapor, positioned 5 cm above the liquid nitrogen surface, for 15 minutes, before being immersed in liquid nitrogen (-196°C). For post-thaw evaluation, samples were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds. For Anku, the sperm concentration was $8552.27 \times 10^6/\text{mL}$. With the OptiXcell extender at a 1:40 dilution, fresh and post-thaw results showed, respectively, a total motility (TM) of 66.42% and 9.29%, and progressive motility (PM) of 58.29% and 6.24%. With the Optidyl extender at a 1:20 dilution, fresh and post-thaw results were TM of 99.64% and 14.17%, and PM of 98.32% and 10.71%. For Puky, the sperm concentration was $2705.31 \times 10^6/\text{mL}$. Using the OptiXcell extender at a 1:40 dilution, fresh and post-thaw results showed TM of 75.04% and 34.31%, and PM of 66.61% and 30.98%. With the Optidyl extender at a 1:30 dilution, results were TM of 86.36% and 17.9%, and PM of 79.2% and 11.61%. The results demonstrate that pharmacological semen collection is viable for *T. ornatus*, with the potential for incorporation into annual management and the formation of germplasm banks. High sperm concentrations and good initial motility were observed; however, the post-thaw reduction indicates sperm damage associated with cryopreservation. Evaluation by the AndroScope requires adequate dilutions to avoid cellular overlap, with dilutions of 1:40 and 1:30 being the most reliable. These results indicate the need to increase the sample size and optimize cooling and freezing protocols, as well as the efficiency of these and other extenders for the species.

Keywords: Ursidae, reproductive biotechnologies, conservation, germplasm, biobank.

Legal authorizations: Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) under registration number RD N°D000044-2025-MIDAGRI-SERFOR-DGGSPFFS-DGSPFS. Lima, Peru.

Acknowledgments and funders: We thank the PATPAL - Huachipa team for their support. This research was funded by Universidad Nacional de San Marcos (RR No. 005446-2025-R-UNMSM), project A25081081 – PCONFIGI 2025.

Validação de técnicas de avaliação da cromatina espermática de emas (*Rhea americana*)

Alexandre Rodrigues Silva¹, Isaac Lemuel Bezerra da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Andreia Maria Silva¹, Débora Rebeca Targino da Cruz¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Moacir Franco de Oliveira¹

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido
E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

A ema (*Rhea americana*) é uma ave nativa da América do Sul de grande importância ecológica na manutenção da biodiversidade. Atualmente está 'quase ameaçada' e poucos estudos abordam sua biologia reprodutiva. Embora o espermatozoide da espécie já tenha sido previamente caracterizado, necessita-se da validação de novos testes para o entendimento de outros parâmetros fisiológicos de seus gametas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi estabelecer técnicas para avaliação da integridade da cromatina de espermatozoides de emas por meio do corante Azul de Toluidina (AT) e do fluoróforo Laranja de Acridina (LA). Foram utilizados seis machos adultos, sendo recuperados os espermatozoides dos ductos deferentes por meio da técnica de flutuação. Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto ao número de espermatozoides recuperados, parâmetros cinéticos obtidos por análise computadorizada, viabilidade por meio das sondas fluorescentes Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo, funcionalidade da membrana celular pelo teste hiposmótico e morfologia espermática em esfregaços corados com Rosa de Bengala. Para avaliações do DNA, parte das amostras foi, inicialmente, incubada com ribonuclease e, em seguida, submetida ao *flash frozen* (congelamento rápido em nitrogênio líquido seguido de descongelação lenta, repetido três vezes) para induzir alterações na cromatina espermática. Em seguida, foram definidos três tratamentos: T0 (100% de espermatozoides danificados), T50 (proporção 50%:50% de danificados e frescos) e T100 (100% frescos). Para avaliar a compactação da cromatina com AT, esfregaços foram fixados em etanol:ácido acético (3:1) e etanol 70%, submetidos à hidrólise em HCl 4M, corados e analisados em microscopia de campo claro (40×), contando-se 500 células por amostra, classificadas como cromatina normal (azul clara) ou descondensada (azul escura a roxa). Para avaliar a fragmentação do DNA com LA, esfregaços foram fixados em solução de Carnoy, desnaturados em tampão (ácido cítrico e fosfato dissódico a 75 °C), submetidos ao LA e analisados em microscopia de fluorescência, avaliando-se 100 células por amostra, classificadas como íntegras (verde) ou fragmentadas (amarelo a vermelho). Os dados foram expressos em média ± erro padrão, comparando-se os tratamentos por teste t de Student. Foram determinadas correlações entre a porcentagem de cromatina íntegra e os parâmetros espermáticos, utilizando-se a regressão linear simples para identificar associação entre os tratamentos do flash frozen e a porcentagem de espermatozoides com cromatina íntegra. As amostras coletadas possuíam uma média de $242,9 \pm 30,2 \times 10^6$ de espermatozoides recuperados, $33,3 \pm 2,5\%$ de motilidade total, $4,8 \pm 0,5\%$ de motilidade progressiva, $67,7 \pm 5,6\%$ de viabilidade, $61,4 \pm 9,6\%$ de membranas funcionais e $87,8 \pm 3,2\%$ de espermatozoides normais, estando dentro do esperado para a espécie. No uso de AT, foram observados $56,7 \pm 14,4\%$ de células com cromatina normal no T0; $65,1 \pm 12,7\%$ no T50; e $97,6 \pm 1,08\%$ no T100. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre o T0 e o T50 e nem entre T50 e T100. A regressão mostrou uma fraca relação ($R^2 = 0,29$) entre os tratamentos e a porcentagem de cromatina íntegra. Já no LA, os resultados médios indicaram $8,8 \pm 4,1\%$ de cromatina íntegra no T0, $54,5 \pm 7,9\%$ no T50, e $78,7 \pm 10,6\%$ no T100. Foram observadas diferenças ($P < 0,05$) entre os tratamentos, mas não foram observadas correlações entre a porcentagem de cromatina íntegra com a motilidade total, viabilidade e funcionalidade. Porém, foi observada forte associação ($R^2 = 0,7032$) entre os tratamentos e a porcentagem de cromatina íntegra. Em conclusão, o AT apresenta baixo valor preditivo na avaliação da integridade da cromatina de espermatozoides de emas, enquanto o LA demonstrou ser eficiente, podendo ser utilizado em análises rotineiras.

Palavras-chave: Azul de Toluidina, Laranja de Acridina, aves, DNA, reprodução animal

Autorizações legais: CEUA/UFERSA: 31/2025; ICMbio/IBAMA: n. 73638-1

Agradecimentos e financiadores: CNPq

Validation of techniques for evaluating sperm chromatin in rheas (*Rhea americana*)

Alexandre Rodrigues Silva¹, Isaac Lemuel Bezerra da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Andreia Maria Silva¹, Débora Rebeca Targino da Cruz¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Moacir Franco de Oliveira¹

¹Universidade Federal Rural do Semi-Árido
E-mail: alexrs@ufersa.edu.br

The rhea (*Rhea americana*) is a bird native to South America of great ecological importance in maintaining biodiversity. Currently, it is considered 'near threatened,' and few studies address its reproductive biology. Although the species' sperm has been previously characterized, further tests are needed to understand other physiological parameters of its gametes. In this sense, the objective of this work was to establish techniques for evaluating the chromatin integrity of rhea sperm using Toluidine Blue (TB) stain and Acridine Orange (AO) fluorophore. Six adult males were used, and spermatozoa were recovered from the vas deferens using the flotation technique. Subsequently, the samples were evaluated for the number of spermatozoa recovered, kinetic parameters obtained by computerized analysis, viability using Hoechst 33342 and propidium iodide fluorescent probes, cell membrane functionality by the hypoosmotic test, and sperm morphology using smears stained with Rose Bengal. For DNA evaluations, part of the samples was initially incubated with ribonuclease and then subjected to flash freezing (rapid freezing in liquid nitrogen followed by slow thawing, repeated three times) to induce changes in sperm chromatin. Three treatments were then defined: T0 (100% damaged spermatozoa), T50 (50%:50% damaged and fresh ratio), and T100 (100% fresh). To evaluate chromatin compaction with TB, smears were fixed in ethanol:acetic acid (3:1) and 70% ethanol, hydrolyzed in 4M HCl, stained, and analyzed by bright-field microscopy (40×), counting 500 cells per sample, which were classified as normal chromatin (light blue) or decondensed chromatin (dark blue to purple). To evaluate DNA fragmentation with AO, smears were fixed in Carnoy's solution, denatured in buffer (citric acid and disodium phosphate at 75 °C), subjected to AO, and analyzed by fluorescence microscopy, counting 100 cells per sample that were classified as intact (green) or fragmented (yellow to red). Data were expressed as mean ± standard error and treatments were compared using Student's t-test. Correlations were determined between the percentage of intact chromatin and sperm parameters, and simple linear regression was performed to identify associations between flash frozen treatments and the percentage of spermatozoa with intact chromatin. The collected samples had an average of $242.9 \pm 30.2 \times 10^6$ recovered spermatozoa, $33.3 \pm 2.5\%$ total motility, $4.8 \pm 0.5\%$ progressive motility, $67.7 \pm 5.6\%$ viability, $61.4 \pm 9.6\%$ functional membranes, and $87.8 \pm 3.2\%$ normal spermatozoa, within the expected range for the species. Using TB, $56.7 \pm 14.4\%$ of cells with normal chromatin were observed at T0; $65.1 \pm 12.7\%$ at T50; and $97.6 \pm 1.08\%$ at T100. There was no difference ($P > 0.05$) between T0 and T50, nor between T50 and T100. Regression analysis showed a weak relationship ($R^2 = 0.29$) between treatments and the percentage of intact chromatin. For AO, the average results indicated $8.8 \pm 4.1\%$ intact chromatin at T0, $54.5 \pm 7.9\%$ at T50, and $78.7 \pm 10.6\%$ at T100. Differences ($P < 0.05$) were observed between treatments, but no correlations were found between the percentage of intact chromatin and total motility, viability, and functionality. However, a strong association ($R^2 = 0.7032$) was observed between treatments and the percentage of intact chromatin. In conclusion, TB has low predictive value in assessing the chromatin integrity of rhea spermatozoa, while AO proved to be efficient and can be used in routine analyses.

Keywords: Toluidine blue, Acridine orange, birds, DNA, animal reproduction

Legal authorizations: CEUA/UFERSA: 31/2025; ICMbio/IBAMA: n. 73638-1

Acknowledgments and funders: CNPq