

Avaliação andrológica e termográfica testicular de ovinos criados em clima tropical úmido

Sávio Lins Pimentel¹, Aluizio Otávio Almeida da Silva¹, Alysson Jorge de Oliveira Sousa², Welligton Conceição da Silva³, Clívyda da Silva da Costa¹, Thámila Marcela Santos Mota¹, Beatriz Lima Guerreiro¹, Lucas Santos Carvalho¹, Lucas Rodrigues Lopes¹, Lílian Katia Ximenes Silva¹

¹Universidade Federal do Pará, ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará,

³Universidade da Amazônia

E-mail: saviolins021@gmail.com

O conhecimento de características fisiológicas e/ou adaptativas de machos reprodutores contribui para a manutenção de animais com maior potencial produtivo e reprodutivo no rebanho e a expansão da ovinocultura no país. Diante disso, objetivou-se avaliar o perfil andrológico e termográfico de ovinos criados em clima tropical úmido. O estudo foi conduzido na Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), localizada no município de Castanhal/PA. Foram utilizados sete (7) ovinos machos, mestiços, com idade e peso médio de **17,1±1,5 meses** e 50 kg, respectivamente. Os animais foram mantidos em baias com alimentação no cocho a base de volumoso (*Panicum maximum*) e concentrado, com água e sal mineral *ad libitum*. Foram obtidas médias da temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante todo o período experimental (dezembro a março) de uma estação meteorológica (A202) localizada na cidade onde o estudo foi conduzido. Mensalmente, no turno da tarde os ovinos foram submetidos a avaliação de parâmetros fisiológicos, como: frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e temperatura retal (TR), por observação de movimentos tóraco-abdominais (mov/min), auscultação com estetoscópio (bat/min) e aferição com termômetro clínico retal (°C), respectivamente. Além disso, foi realizada a tomada da temperatura da superfície testicular (TST), com auxílio de uma câmera infravermelho (FLIR C8), e a mensuração da circunferência escrotal (CE) com uma fita específica na região de maior diâmetro do escroto. Na sequência, foi realizada a colheita de sêmen, pelo método da vagina artificial, e a avaliação dos parâmetros de turbilhonamento (0-5), motilidade (%), vigor (1-5) e defeitos espermáticos (%). A análise estatística foi realizada pelo Programa Graphpad Prism 9, usando a ANOVA para variáveis com distribuição normal e o teste de Friedman para dados sem normalidade, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Observou-se oscilações significativas no período estudado ($p < 0,001$), caracterizando redução na temperatura ambiente média e aumento na umidade relativa do ar. Este fato provavelmente é devido ao início do período considerado mais chuvoso na região. Entretanto, essas mudanças climatológicas não exerceram efeito sobre os parâmetros fisiológicos e testiculares dos ovinos ($p > 0,05$), uma vez que ao longo dos meses (dezembro a março), a FC (74,8±7,9, 72,5±3,6, 69,7±5,0, 85,1±14,7), FR (37,1±16,2, 29,7±2,1, 32,0±3,2, 40,4±14,8), TR (38,7±0,3, 38,9±0,4, 38,5±0,5, 38,8±0,4) e CE (26,3±1,4, 28,0±1,9, 26,3±1,3, 26,3±1,7) mantiveram-se sem variações ($p > 0,05$). Isso evidencia, plena adaptação dos animais ao ambiente e confirma que os mesmos se encontram sem indícios clínicos de estresse térmico. Por se tratar de animais adultos, pode-se considerar normal a ausência de aumento linear da biometria testicular. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) ao longo do tempo nas variáveis seminais de turbilhonamento (3,0±0,5, 3,1±0,6, 4,0±0,8, 4,5±0,3), motilidade (70,0±5,7, 72,8±7,5, 75,7±9,7, 74,2±9,7), vigor (3,0±0,5, 3,0±0,5, 3,5±0,5, 4,2±0,4) e defeitos espermáticos (22,4±16,2, 27,7±18,6, 14,8±14,6, 15,5±2,6). A manutenção desses valores sugere que o mecanismo de termorregulação testicular se manteve eficiente, assim como à espermatogênese. A TST manteve-se sem variações ($p > 0,05$) ao longo dos meses, entretanto foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre o cordão espermático, o polo testicular proximal, o polo testicular distal e a cauda do epidídimo, sendo de 37,3±0,1°C, 34,9±0,2°C, 33,8±0,1°C e 30,2±0,3°C, respectivamente. A observação do padrão de temperatura decrescente desde a região do cordão espermático até a cauda do epidídimo demonstra adequado mecanismo termorregulatório testicular. Conclui-se que os ovinos mantiveram o padrão de normalidade para todas as variáveis estudadas, o que demonstra boa adaptabilidade de animais mestiços mantidos em regiões de clima tropical.

Palavras-chave: andrologia, sêmen, estresse térmico, temperatura de superfície, ovinocultura.

Autorizações legais: CEUA/UFPA n. do protocolo: 2652040326 CEP/UFPA: 68741-740

Andrological and testicular thermographic evaluation of sheep raised in a humid tropical climate

Sávio Lins Pimentel¹, Aluizio Otávio Almeida da Silva¹, Alysso Jorge de Oliveira Sousa², Welligton Conceição da Silva³, Clívyva da Silva da Costa¹, Thâmila Marcela Santos Mota¹, Beatriz Lima Guerreiro¹, Lucas Santos Carvalho¹, Lucas Rodrigues Lopes¹, Lílian Katia Ximenes Silva¹

¹Universidade Federal do Pará, ²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará,

³Universidade da Amazônia

E-mail: saviolins021@gmail.com

Knowledge of the physiological and adaptive characteristics of breeding males contributes to maintaining animals with higher productive and reproductive potential in the herd and the expansion of sheep farming in the country. Thus, the objective was to evaluate the andrological and thermographic profile of sheep raised in a humid tropical climate. The study was conducted at the Animal Reproduction Biotechnology Center (CEBRAN/UFPA), located in Castanhal/PA. Seven crossbred male sheep were used, with a mean age and weight of 17.1 ± 1.5 months and 50 kg, respectively. The animals were kept in pens with trough feeding based on roughage (*Panicum maximum*) and concentrate, with water and mineral salt *ad libitum*. Mean ambient temperature and relative humidity were measured. Significant oscillations were observed throughout the experimental period (December to March) from a meteorological station (A202) located in the city where the study was conducted. Monthly, during the afternoon period, the sheep underwent evaluation of physiological parameters: heart rate (HR), respiratory rate (RR), and rectal temperature (RT). Additionally, testicular surface temperature (TST) was recorded using an infrared camera (FLIR C8®), and scrotal circumference (SC) was measured. Subsequently, semen was collected via artificial vagina to evaluate mass motility (0-5), motility (%), vigor (1-5), and sperm defects (%). Statistical analysis was performed using Graphpad® Prism 9 (ANOVA or Friedman test, $p < 0.05$). Significant variations were observed in the studied period ($p < 0.001$), characterized by a reduction in mean ambient temperature and an increase in relative humidity, likely due to the onset of the rainy season. However, these climatological changes had no effect on the physiological and testicular parameters of the sheep ($p > 0.05$). Throughout the months, HR (74.8 ± 7.9 ; 72.5 ± 3.6 ; 69.7 ± 5.0 ; 85.1 ± 14.7), RR (37.1 ± 16.2 ; 29.7 ± 2.1 ; 32.0 ± 3.2 ; 40.4 ± 14.8), RT (38.7 ± 0.3 ; 38.9 ± 0.4 ; 38.5 ± 0.5 ; 38.8 ± 0.4), and SC (26.3 ± 1.4 ; 28.0 ± 1.9 ; 26.3 ± 1.3 ; 26.3 ± 1.7) remained stable ($p > 0.05$). This highlights the animals' adequate adaptation and confirms the absence of clinical signs of heat stress. No significant differences ($p > 0.05$) were observed over time in seminal variables: mass motility (3.0 ± 0.5 to 4.5 ± 0.3), motility (70.0 ± 5.7 to 74.2 ± 9.7), vigor (3.0 ± 0.5 to 4.2 ± 0.4), and sperm defects (22.4 ± 16.2 to 15.5 ± 2.6). While TST did not vary across months ($p > 0.05$), a statistical difference ($p < 0.05$) was observed between the spermatic cord ($37.3 \pm 0.1^\circ\text{C}$), proximal testicular pole ($34.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$), distal testicular pole ($33.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$), and the tail of the epididymis ($30.2 \pm 0.3^\circ\text{C}$). This decreasing temperature gradient demonstrates an adequate testicular thermoregulatory mechanism. It is concluded that the sheep maintained normal values for all evaluated variables, demonstrating the adaptability of crossbred animals in tropical climates.

Keywords: andrology, semen, heat stress, surface temperature, sheep production.

Legal authorizations: CEUA/UFPA Protocol No.: 2652040326 CEP/UFPA: 68741-740

Desenvolvimento de nanoformulações para a criopreservação de sêmen ovino e o impacto na atividade mitocondrial pós-descongelamento

Matheus Soares da Silva Melo¹, Lucas dos Santos Andrade¹, Alan Rocha dos Santos Silva², Lindomara Cristina Félix da Silva¹, Luís Felipe Alves da Silva¹, Lucas Silva da Cruz¹, Camilla Flávia Avelino de Farias¹, Valdir Moraes de Almeida², Francisco Humberto Xavier Júnior¹, Sildivane Valcácia Silva¹

¹Universidade Federal da Paraíba, ²Universidade Federal de Campina Grande
E-mail: mxthevs@gmail.com

A criopreservação de sêmen ovino induz danos estruturais e funcionais às mitocôndrias, resultando em queda da motilidade e do potencial fértil. A utilização de nanotecnologia associada a compostos bioativos de plantas nativas, como a macaúba (*Acrocomia aculeata*), surge como alternativa para mitigar essas crioinjúrias. A enzima citocromo c oxidase é um marcador crucial da integridade da cadeia respiratória mitocondrial, podendo ser avaliada pelo teste de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). No presente estudo, objetivou-se desenvolver e caracterizar nanoemulsões (NE) à base de óleo de macaúba (obtidos via CO₂ supercrítico) e avaliar o efeito destas sobre a atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos pós-descongelamento. Foram produzidas duas NE, compostas por: 1) Óleo da amêndoa da macaúba + Lipoid S100 + Pluronic F-68 (NEA); 2) Óleo da polpa + Lipoid S100 + Pluronic F-68 (NEP). Como controles, foram utilizadas duas nanoformulações: 3) Lipoid S100 e Pluronic F-68 (NLP); e 4) Apenas fosfatidilcolina (NFC). Para a caracterização das nanoformulações (1 a 4), foram realizados os testes de diâmetro hidrodinâmico (nm), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (mV). Para a avaliação da atividade mitocondrial, foram utilizados 10 pools (repetições), formados a partir dos ejaculados de três carneiros da raça Santa Inês. Posteriormente, essas amostras (pools) foram diluídas (400 x 10⁶/mL) em cinco grupos: NEA, NEP, NLP, NFC e o diluidor comercial BotuBov® (GC), que foi utilizado como controle padrão. Em seguida foi realizada a congelação (TK 3000®) com taxa de refrigeração de -0,25 °C/min, acrescida de 120 minutos de estabilização, seguido de curva de congelação de -20 °C/min, partindo de 5 °C até atingir -120 °C e armazenamento em N₂ líquido (-196 °C). Pós-descongelamento (37°C por 30s), a atividade da citocromo c oxidase foi determinada pela técnica de DAB. Os espermatozoides foram classificados em categorias de I (alta atividade) a IV (ausência de atividade), conforme a presença de coloração amarronzada na peça intermediária. Em seguida, a cada classe foi determinado um fator de correção (I: 1,0; II: 0,5; III: 0,25; IV: 0) utilizado para calcular o índice de atividade citoquímica (IAC) das amostras. Para análise estatística, os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade, seguidos de ANOVA e teste de Tukey (p<0,05), no software Statistica 64. As formulações desenvolvidas apresentaram diâmetros entre 118,7 e 154,1 nm, PDI < 0,3 (exceto NLP: 0,42) e potencial zeta entre -21,33 e -4,81 mV. Foi possível observar efeito significativo dos tratamentos sobre a atividade mitocondrial (p<0,001). O tratamento NEP apresentou o maior IAC (61,32±7,00%), sendo superior (p<0,05) aos grupos NFC (47,70±10,58%) e NLP (40,59±8,63%). Os grupos NEA (55,07±4,89%) e GC (52,93±10,86%) apresentaram comportamentos semelhantes, não diferindo significativamente entre si ou em relação ao NEP (p>0,05). O grupo NLP demonstrou a menor capacidade de preservação da função mitocondrial, com redução acentuada da atividade enzimática em comparação ao NEP (p<0,001) e ao GC (p<0,005). Esses resultados demonstram que as NE produzidas com os óleos de macaúba são eficazes em manter a atividade citoquímica dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação. Tais achados se devem, possivelmente, à presença de compostos bioativos nesses óleos como carotenoides (polpa) e tocoferóis (amêndoa) e à implementação de nanotecnologia na produção dos diluidores experimentais, que permitiu a obtenção de um diluidor a base de óleos dispersos em meio aquoso, resultando na preservação da integridade da cadeia respiratória espermática.

Palavras-chave: nanobiotecnologia, macaúba, nanossistema, fosfolipídio

Autorizações legais: CEUA/UFCG: protocolo N° 36/2025

Agradecimentos e financiadores: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Development of nanoformulations for the cryopreservation of ram semen and their impact on mitochondrial activity after thawing

Matheus Soares da Silva Melo¹, Lucas dos Santos Andrade¹, Alan Rocha dos Santos Silva², Lindomara Cristina Félix da Silva¹, Luís Felliipe Alves da Silva¹, Lucas Silva da Cruz¹, Camilla Flávia Avelino de Farias¹, Valdir Morais de Almeida², Francisco Humberto Xavier Júnior¹, Sildivane Valcácia Silva¹

¹Universidade Federal da Paraíba, ²Universidade Federal de Campina Grande
E-mail: mxthevs@gmail.com

The cryopreservation of ram semen induces structural and functional damage to mitochondria, resulting in decreased motility and fertility potential. The use of nanotechnology associated with bioactive compounds from native plants, such as macauba palm (*Acrocomia aculeata*), emerges as an alternative to mitigate this cryodamage. The enzyme cytochrome c oxidase is a crucial marker of mitochondrial respiratory chain integrity and can be assessed using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) assay. The present study aimed to develop and characterize nanoemulsions (NE) based on macauba oil (obtained via supercritical CO₂ extraction) and to evaluate their effect on mitochondrial activity of ovine spermatozoa post-thaw. NE were produced comprising macauba oil, using either kernel oil (NEA) or pulp oil (NEP), and the surfactants Lipoid S100 and Pluronic F-68. As controls, one nanoformulation containing only surfactants (NLP) and another containing only the phospholipid phosphatidylcholine (NFC) were used. To characterize the experimental groups, hydrodynamic diameter (nm), polydispersity index (PDI), and zeta potential (mV) were determined. For the evaluation of mitochondrial activity, 10 pools (replicates) were used, formed from the ejaculates of three Santa Inês breed rams. Subsequently, these samples (pools) were diluted (400 x 10⁶/mL) into five groups: NEA, NEP, NLP, NFC, and the commercial diluent BotuBov® (GC), which was used as a standard control. Freezing was then performed (TK 3000®) at a cooling rate of -0.25 °C/min plus 120 minutes of equilibration, followed by a freezing curve of -20 °C/min from 5 °C to -120 °C, and storage in liquid nitrogen (-196 °C). Post-thaw (37°C for 30 s), cytochrome c oxidase activity was determined using the DAB technique. Spermatozoa were classified into categories from I (high activity) to IV (no activity) based on the presence of brownish staining in the midpiece. Subsequently, a correction factor was assigned to each class (I: 1.0; II: 0.5; III: 0.25; IV: 0) and used to calculate the cytochemical activity index (CAI) of the samples. For statistical analysis, data were subjected to normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity tests, followed by ANOVA and Tukey's test (p<0.05), using Statistica 64 software. The developed formulations exhibited diameters ranging from 118.7 to 154.1 nm, PDI < 0.3 (except NLP: 0.42), and zeta potential ranging from -21.33 to -4.81 mV. A significant treatment effect on mitochondrial activity was observed (p<0.001). The NEP treatment exhibited the highest CAI (61.32±7.00%), being significantly superior (p<0.05) to the NFC (47.70±10.58%) and NLP (40.59±8.63%) groups. The NEA (55.07±4.89%) and GC (52.93±10.86%) groups exhibited similar performance, with no significant differences between them or compared to the NEP group (p>0.05). The NLP group demonstrated the lowest capacity for preserving mitochondrial function, with a marked reduction in enzymatic activity compared to the NEP (p<0.001) and GC (p<0.005) groups. These results demonstrate that NE produced with macauba oils are effective in maintaining the cytochemical activity of ovine spermatozoa subjected to cryopreservation. These findings are possibly attributed to the presence of bioactive compounds in these oils, such as carotenoids (pulp) and tocopherols (kernel), and the implementation of nanotechnology in the production of experimental extenders, which enabled the development of an oil-based extender dispersed in aqueous medium, resulting in preservation of spermatozoan respiratory chain integrity.

Keywords: nanobiotechnology, macaiba, nanosystem, phospholipid.

Legal authorizations: CEUA/UFCG: protocol number 36/2025

Acknowledgments and funders: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Efeito da nicotinamida e do colesterol sobre a atividade mitocondrial de espermatozoides de ovinos criopreservados

Beatriz Cavalcanti de Freitas¹, Mabel Freitas Cordeiro¹, Elenice Andrade Moraes¹, Davi Felipe Soares Coelho¹, Jairo José da Silva Santos¹, Guilherme Rocha Moreira², Pedro Humberto Félix de Sousa³, Rafael Soares dos Anjos¹, Bruna Moura Silva¹, Edilson Soares Lopes Júnior¹

¹Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, ²Universidade Federal Rural de Pernambuco, ³Universidade do Estado da Bahia
E-mail: biiahcfreitas@gmail.com

Durante a criopreservação, o estresse oxidativo pode comprometer a integridade dos espermatozoides de ovinos (*Ovis aries*), afetando parâmetros essenciais como a motilidade, a integridade de membrana e, especialmente, a atividade mitocondrial espermática, a qual está diretamente relacionada à produção de energia e à capacidade fecundante. A nicotinamida (NAM) atua como antioxidante, reduzindo os danos oxidativos, enquanto o colesterol (COL) contribui para a fluidez e estabilidade da membrana espermática durante os processos de congelamento e descongelamento. No entanto, ainda são escassos os relatos sobre o uso da nicotinamida na criopreservação de sêmen ovino, assim como são limitados os estudos que investigam sua associação com o colesterol nesse contexto, evidenciando uma lacuna no conhecimento científico. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de nicotinamida e colesterol sobre a atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos após a descongelamento. O delineamento experimental adotado foi em quadrado latino 6×6, no qual cada animal foi submetido a todos os tratamentos ao longo de seis períodos experimentais, com intervalo de 2 dias entre as colheitas, controlando-se os efeitos de animal e período. Em cada período, foi realizada a colheita de um ejaculado por animal, destinado ao respectivo tratamento conforme a estrutura do delineamento. Os ejaculados, obtidos pelo método da vagina artificial (confeccionada artesanalmente), foram diluídos em meio Tris-gema à temperatura de 35 °C, com ou sem adição de NAM e/ou COL (Sigma-Aldrich®, EUA), nas seguintes concentrações: CON (controle), COL (2 mg de COL), NAM30 (30 µM de NAM), NAM60 (60 µM de NAM), NAM30+COL (30 µM de NAM + 2 mg de COL) e NAM60+COL (60 µM de NAM + 2 mg de COL). O colesterol foi incorporado juntamente com a nicotinamida por 15 minutos. Em seguida, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, refrigerado a 4 °C por 24 horas e posteriormente disposto a aproximadamente 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido, em vapor, por 15 minutos antes da submersão e armazenamento em botijão criogênico a -196 °C. As amostras foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos. A atividade mitocondrial foi avaliada por coloração com Rodamina 123. Para isso, alíquotas de 10 µL de sêmen foram adicionadas a 2 µL do corante em microtubos de 1,5 mL, incubadas a 37 °C por 8 minutos em banho-maria, sob proteção da luz. Após incubação, 10 µL foram depositados entre lâmina e lamínula previamente aquecidas e analisados em microscópio de fluorescência (AXIO Image A2®, Carl Zeiss, Alemanha), em aumento de 400×. Foram avaliados 200 espermatozoides por amostra, classificados quanto à presença (atividade mitocondrial) ou ausência (inatividade) de fluorescência verde na cauda. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), adotando-se nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$). Os resultados demonstraram valores médios de atividade mitocondrial de 25,90 ± 24,10 (CON), 15,35 ± 34,63 (COL), 34,85 ± 14,97 (NAM30), 28,10 ± 21,85 (NAM60), 33,12 ± 15,94 (NAM30+COL) e 24,45 ± 25,55 (NAM60+COL). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P > 0,05$). Conclui-se que a adição de nicotinamida e colesterol, nas concentrações e condições avaliadas, não influencia a atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos após a criopreservação.

Palavras-chave: antioxidante, carneiro, estresse oxidativo, fluorescência, vitamina B3

Autorizações legais: Trabalho aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), registrado sob o protocolo de Nº 0002/260924.

Agradecimentos e financiadores: À UNIVASF e ao PPGCA, à CAPES pelo suporte (PROAP), ao LAFIBRA e CPSENS pelo apoio técnico, ao Setor de Ovinocultura e ao Prof. Pedro Humberto Félix de Sousa pelo auxílio na pesquisa geral e amplo.

Effect of nicotinamide and cholesterol on the mitochondrial activity of cryopreserved ovine spermatozoa

Beatriz Cavalcanti de Freitas¹, Mabel Freitas Cordeiro¹, Elenice Andrade Moraes¹, Davi Felipe Soares Coelho¹, Jairo José da Silva Santos¹, Guilherme Rocha Moreira², Pedro Humberto Félix de Sousa³, Rafael Soares dos Anjos¹, Bruna Moura Silva¹, Edilson Soares Lopes Júnior¹

¹Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, ²Universidade Federal Rural de Pernambuco, ³Universidade do Estado da Bahia
E-mail: biiahcfreitas@gmail.com

During cryopreservation, oxidative stress can compromise the integrity of ovine spermatozoa (*Ovis aries*), affecting essential parameters such as motility, membrane integrity, and especially sperm mitochondrial activity, which is directly related to energy production and fertilizing capacity. Nicotinamide (NAM) acts as an antioxidant, reducing oxidative damage, while cholesterol (COL) contributes to the fluidity and stability of the sperm membrane during the freezing and thawing processes. However, there are still few reports on the use of nicotinamide in the cryopreservation of ovine semen, and studies investigating its association with cholesterol in this context remain limited, highlighting a gap in scientific knowledge. This study aimed to evaluate the effect of adding nicotinamide and cholesterol on the mitochondrial activity of ovine spermatozoa after thawing. The experimental design adopted was a 6 × 6 Latin square, in which each animal was subjected to all treatments over six experimental periods, with a 2-day interval between collections, controlling for animal and period effects. In each period, one ejaculate per animal was collected and assigned to the respective treatment according to the experimental design. Ejaculates obtained using the artificial vagina method (handmade) were diluted in Tris-egg yolk extender at 35 °C, with or without the addition of NAM and/or COL (Sigma-Aldrich®, USA), at the following concentrations: CON (control), COL (2 mg COL), NAM30 (30 µM NAM), NAM60 (60 µM NAM), NAM30+COL (30 µM NAM + 2 mg COL), and NAM60+COL (60 µM NAM + 2 mg COL). Cholesterol was incorporated together with nicotinamide for 15 minutes. Subsequently, the semen was packaged into 0.25 mL straws, cooled to 4 °C for 24 hours, and then placed approximately 5 cm above the level of liquid nitrogen (in vapor) for 15 minutes before being plunged and stored in a cryogenic tank at -196 °C. Samples were thawed at 37 °C for 30 seconds. Mitochondrial activity was assessed using Rhodamine 123 staining. For this, 10 µL semen aliquots were added to 2 µL of the dye in 1.5 mL microtubes and incubated at 37 °C for 8 minutes in a water bath, protected from light. After incubation, 10 µL were placed between a slide and coverslip (previously warmed) and analyzed under a fluorescence microscope (AXIO Image A2®, Carl Zeiss, Germany) at 400× magnification. A total of 200 spermatozoa per sample were evaluated and classified according to the presence (mitochondrial activity) or absence (inactivity) of green fluorescence in the tail. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), adopting a significance level of 5% ($P \leq 0.05$). The results showed mean mitochondrial activity values of 25.90 ± 24.10 (CON), 15.35 ± 34.63 (COL), 34.85 ± 14.97 (NAM30), 28.10 ± 21.85 (NAM60), 33.12 ± 15.94 (NAM30+COL), and 24.45 ± 25.55 (NAM60+COL). No statistical differences were observed among treatments ($P > 0.05$). It can be concluded that the addition of nicotinamide and cholesterol, at the evaluated concentrations and conditions, does not influence the mitochondrial activity of ovine spermatozoa after cryopreservation.

Keywords: Antioxidant, fluorescence, oxidative stress, ram, vitamin B3.

Keywords: antioxidant, ram, oxidative stress, fluorescence, vitamin B3

Legal authorizations: This study was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of the São Francisco Valley (UNIVASF), under protocol No. 0002/260924.

Acknowledgments and funders: UNIVASF; Graduate Program in Animal Science; CAPES for financial support (PROAP); LAFIBRA and CPSENS for technical support; Sheep Sector and Prof. Pedro H. F. de Sousa for research assistance.

Efeito da nicotinamida e do colesterol sobre a integridade do DNA de espermatozoides ovinos antes e após a criopreservação

Beatriz Cavalcanti de Freitas¹, Mabel Freitas Cordeiro¹, Elenice Andrade Moraes¹, Davi Felipe Soares Coelho¹, Jairo José da Silva Santos¹, Guilherme Rocha Moreira², Pedro Humberto Félix de Sousa³, Érika Karoline de Oliveira Aureliano¹, Andreza Mayara Carneiro Lima¹, Edilson Soares Lopes Júnior¹

¹Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, ²Universidade Federal Rural de Pernambuco, ³Universidade do Estado da Bahia
E-mail: biiahcfreitas@gmail.com

O estresse oxidativo causado pela criopreservação compromete a funcionalidade espermática, afetando motilidade, integridade de membrana e, especialmente, o DNA, essencial para a fecundação e o desenvolvimento embrionário. A nicotinamida (NAM) atua como antioxidante, reduzindo danos oxidativos, enquanto o colesterol (COL) contribui para a estabilidade da membrana durante a congelamento e descongelamento. Contudo, ainda são escassos estudos sobre o uso da nicotinamida na criopreservação de sêmen ovino (*Ovis aries*), bem como sobre sua associação com o colesterol nesse contexto. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da nicotinamida e do colesterol sobre a fragmentação de DNA dos espermatozoides ovinos antes e depois da criopreservação. Ejaculados de seis carneiros foram obtidos através do método de vagina artificial e diluídos em meio Tris-gema, com ou sem a adição de NAM ou COL, nas seguintes concentrações: CON (controle), COL (2 mg de COL), NAM30 (30 µM de NAM), NAM60 (60 µM de NAM), NAM30+COL (30 µM de NAM + 2 mg de COL) e NAM60+COL (60 µM de NAM + 2 mg de COL). O delineamento experimental adotado foi em quadrado latino 6×6, no qual cada animal foi submetido a todos os tratamentos ao longo de seis períodos experimentais, controlando-se os efeitos de animal e período. Em cada período, foi realizada a coleta de um ejaculado por animal, sendo este destinado ao respectivo tratamento conforme a estrutura do delineamento. Após 15 min para incorporação do colesterol, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25 mL, refrigerado a 4°C por 24 h e, posteriormente, exposto ao vapor de nitrogênio líquido antes de ser submerso e armazenado em botijão criogênico a -196 °C. As amostras foram descongeladas à 37°C/30s. A integridade do DNA espermático foi avaliada antes e após a criopreservação, por meio da técnica de coloração com azul de toluidina. Para isso, 10 µL de sêmen de cada tratamento foram utilizados para a confecção de esfregaços em lâminas, os quais foram secos ao ar e fixados em solução de etanol-acetona (96%), por 30 minutos. Após nova secagem, os esfregaços foram submetidos à hidrólise em HCl 0,1 N por 5 minutos, seguida de lavagens em água destilada. Em seguida, as amostras foram coradas com azul de toluidina a 0,05%, por 20 minutos e novamente lavadas. As lâminas foram, então, cobertas com lamínula e avaliadas em microscópio óptico, em aumento de 1000X. Foram analisadas 200 células por amostra, em campos aleatórios, sendo classificadas como portadoras de DNA íntegro aquelas com ausência ou baixa coloração azul, e como fragmentadas aquelas com coloração variando de azul escuro a violeta. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e os resultados foram expressos como média ± erro padrão. Não foi observado efeito significativo dos tratamentos sobre a integridade do DNA espermático no sêmen *in natura* ($P > 0,05$), com valores de $96,83 \pm 1,16$ (CON), $95,33 \pm 2,45$ (COL), $95,42 \pm 1,61$ (NAM30), $96,25 \pm 1,10$ (NAM60), $95,92 \pm 1,13$ (NAM30+COL) e $97,33 \pm 1,00$ (NAM60+COL). Para a comparação entre o sêmen *in natura* e congelado-descongelado, foi aplicado o teste de Wilcoxon para amostras pareadas, sendo observada redução significativa na integridade do DNA espermático após a criopreservação em relação ao sêmen *in natura* ($P < 0,05$) em todos os tratamentos com valores de $67,52 \pm 1,92$ (CON), $57,41 \pm 6,40$ (COL), $59,12 \pm 2,94$ (NAM30), $67,32 \pm 1,83$ (NAM60), $67,00 \pm 3,43$ (NAM30+COL) e $56,82 \pm 3,15$ (NAM60+COL). Não houve diferença estatística entre os tratamentos em nenhuma das condições avaliadas ($P > 0,05$). Conclui-se que a adição de nicotinamida e colesterol, nas concentrações e condições avaliadas, não influencia a integridade do DNA de espermatozoides ovinos. No entanto, a criopreservação reduz a integridade do DNA espermático.

Palavras-chave: antioxidante, carneiro, qualidade seminal, fragmentação de DNA, vitamina B3

Autorizações legais: Estudo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), registrado sob o protocolo de Nº 0002/260924.

Agradecimentos e financiadores: À UNIVASF e ao PPGCA, à CAPES pelo suporte (PROAP), ao LAFIBRA e CPSENS pelo apoio técnico, e ao Setor de Ovinocultura e ao Prof. Pedro Humberto Félix de Sousa pelo auxílio na pesquisa.

Effect of nicotinamide and cholesterol on the DNA integrity of ovine spermatozoa before and after cryopreservation

Beatriz Cavalcanti de Freitas¹, Mabel Freitas Cordeiro¹, Elenice Andrade Moraes¹, Davi Felipe Soares Coelho¹, Jairo José da Silva Santos¹, Guilherme Rocha Moreira², Pedro Humberto Félix de Sousa³, Érika Karoline de Oliveira Aureliano¹, Andreza Mayara Carneiro Lima¹, Edilson Soares Lopes Júnior¹

¹Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, ²Universidade Federal Rural de Pernambuco, ³Universidade do Estado da Bahia
E-mail: biiahcfreitas@gmail.com

Oxidative stress induced by cryopreservation compromises sperm functionality, affecting motility, membrane integrity, and especially DNA integrity, which is essential for fertilization and embryonic development. Nicotinamide (NAM) acts as an antioxidant, reducing oxidative damage, while cholesterol (COL) contributes to membrane stability during the freezing and thawing process. However, studies investigating the use of nicotinamide in the cryopreservation of ovine semen (*Ovis aries*), as well as its association with cholesterol in this context, are still scarce. This study aimed to evaluate the effect of nicotinamide and cholesterol on DNA fragmentation of ovine spermatozoa before and after cryopreservation. Ejaculates from six rams were collected using the artificial vagina method and diluted in Tris–egg yolk extender, with or without the addition of NAM or COL, at the following concentrations: CON (control), COL (2 mg of COL), NAM30 (30 µM NAM), NAM60 (60 µM NAM), NAM30+COL (30 µM NAM + 2 mg COL), and NAM60+COL (60 µM NAM + 2 mg COL). A 6×6 Latin square experimental design was used, in which each animal was subjected to all treatments over six experimental periods, controlling for animal and period effects. In each period, one ejaculate per animal was collected and assigned to the respective treatment according to the experimental design. After 15 minutes for cholesterol incorporation, semen was packaged into 0.25 mL straws, cooled to 4°C for 24 h, and subsequently exposed to liquid nitrogen vapor before being submerged and stored in a cryogenic tank at –196°C. Samples were thawed at 37°C for 30 s. Sperm DNA integrity was evaluated before and after cryopreservation using toluidine blue staining. For this, 10 µL of semen from each treatment were used to prepare smears on slides, which were air-dried and fixed in ethanol–acetone solution (96%) for 30 minutes. After drying again, the smears were subjected to hydrolysis in 0.1 N HCl for 5 minutes, followed by washing in distilled water. The samples were then stained with 0.05% toluidine blue for 20 minutes and washed again. The slides were covered with coverslips and evaluated under a light microscope at 1000× magnification. A total of 200 cells per sample were analyzed in random fields. Cells were classified as having intact DNA when showing no or light blue staining, and as fragmented when presenting dark blue to violet staining. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and results were expressed as mean ± standard error. No significant effect of treatments on sperm DNA integrity was observed in fresh semen ($P>0.05$), with values of 96.83 ± 1.16 (CON), 95.33 ± 2.45 (COL), 95.42 ± 1.61 (NAM30), 96.25 ± 1.10 (NAM60), 95.92 ± 1.13 (NAM30+COL), and 97.33 ± 1.00 (NAM60+COL). For comparisons between fresh and frozen–thawed semen, the Wilcoxon paired test was applied, revealing a significant reduction in sperm DNA integrity after cryopreservation compared to fresh semen ($P<0.05$) in all treatments, with values of 67.52 ± 1.92 (CON), 57.41 ± 6.40 (COL), 59.12 ± 2.94 (NAM30), 67.32 ± 1.83 (NAM60), 67.00 ± 3.43 (NAM30+COL), and 56.82 ± 3.15 (NAM60+COL). No statistical differences were observed among treatments under any of the evaluated conditions ($P>0.05$). It can be concluded that the addition of nicotinamide and cholesterol, at the concentrations and conditions tested, does not influence DNA integrity in ovine spermatozoa. However, cryopreservation reduces sperm DNA integrity.

Keywords: antioxidant, ram, seminal quality, DNA fragmentation, vitamin B3

Legal authorizations: Study approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of the São Francisco Valley (UNIVASF), registered under protocol number 0002/260924.

Acknowledgments and funders: UNIVASF; Graduate Program in Animal Science; CAPES for financial support (PROAP); LAFIBRA and CPSENS for technical support; Sheep Sector and Prof. Pedro H. F. de Sousa for research assistance.

Efeito da pentoxifilina oral sobre a motilidade espermática e porcentagem de espermatozoides rápidos do sêmen de carneiros submetidos à insulação escrotal

Claudio Willian de Oliveira Delfes-Camargo¹, Rogério Araújo de Almeida Filho¹, Amanda Carvalho Silva¹, Marcella Cardoso¹, Henry David Mogollón García¹, Gabriel Augusto Monteiro¹, Eunice Oba¹

¹Universidade Estadual Paulista
E-mail: claudio.willian@unesp.br

A termorregulação testicular é essencial para a manutenção da espermatogênese, sendo a hipertermia um dos principais fatores responsáveis pela redução da qualidade seminal, especialmente sobre parâmetros cinéticos espermáticos. A insulação escrotal constitui um modelo experimental consolidado para indução de degeneração testicular, promovendo alterações transitórias na motilidade espermática. Nesse contexto, a pentoxifilina, que apresenta propriedades hemorreológicas e antioxidantes, foi utilizada considerando a escassez de estudos com sua administração oral em carneiros. Objetivou-se avaliar o efeito da pentoxifilina oral sobre a cinética espermática de carneiros submetidos à insulação escrotal. Foram utilizados 18 carneiros (*Ovis aries*), distribuídos em grupo controle insulado não tratado (n=9) e grupo insulado tratado com pentoxifilina (17 mg/kg, BID, por 60 dias; n=9), administrada por via oral, na forma de pasta, diretamente na cavidade oral. A degeneração testicular foi induzida por insulação escrotal por 72 horas, com uso de fraldas descartáveis. As coletas seminais foram realizadas previamente e semanalmente por 12 semanas, utilizando vagina artificial. A análise cinética foi realizada por sistema computadorizado (CASA), avaliando motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP). Observou-se efeito significativo do tempo sobre MT, MP e RAP ($p < 0,05$), com redução após a insulação escrotal e variações ao longo do período experimental, confirmando a degeneração testicular induzida pela hipertermia. Não houve efeito isolado de grupo ($p > 0,05$). Entretanto, foi observada interação significativa entre grupo e tempo para MT e MP ($p < 0,05$), indicando que a variação desses parâmetros ocorreu de forma distinta entre os grupos, com maior redução inicial no grupo controle, especialmente no dia 7 pós-insulação escrotal, quando a motilidade total foi de aproximadamente 69,5% no grupo controle e 83,1% no grupo tratado, e a motilidade progressiva de 32,7% no controle e 50,4% no tratado, seguida de recuperação gradual ao longo das semanas. Para RAP, não houve interação significativa ($p > 0,05$). De modo geral, o estresse térmico promoveu alterações transitórias na cinética espermática, com recuperação parcial ao longo do período experimental. A pentoxifilina não alterou os valores médios dos parâmetros, porém influenciou o padrão de resposta ao longo do tempo para motilidade total e progressiva.

Palavras-chave: Estresse térmico, CASA, Ovinos, Sêmen

Autorizações legais: CEUA/UNESP: n.000.252

Agradecimentos e financiadores: O autor agradece ao CNPq pela concessão da bolsa e a CAPES pelo apoio ao programa de pós-graduação.

Effect of oral pentoxifylline on sperm motility and percentage of rapid spermatozoa in rams subjected to scrotal insulation

Claudio Willian de Oliveira Delfes-Camargo¹, Rogério Araújo de Almeida Filho¹, Amanda Carvalho Silva¹, Marcella Cardoso¹, Henry David Mogollón García¹, Gabriel Augusto Monteiro¹, Eunice Oba¹

¹Universidade Estadual Paulista
E-mail: claudio.willian@unesp.br

Testicular thermoregulation is essential for the maintenance of spermatogenesis, and hyperthermia is one of the main factors responsible for reduced semen quality, especially affecting sperm kinetic parameters. Scrotal insulation is a well-established experimental model for inducing testicular degeneration, promoting transient alterations in sperm motility. In this context, pentoxifylline, which presents hemorheological and antioxidant properties, was used considering the scarcity of studies involving its oral administration in rams. The aim of this study was to evaluate the effect of oral pentoxifylline on sperm kinetics in rams subjected to scrotal insulation. A total of 18 rams (*Ovis aries*) were used and distributed into an insulated untreated control group (n=9) and an insulated group treated with pentoxifylline (17 mg/kg, BID, for 60 days; n=9), administered orally as a paste directly into the oral cavity. Testicular degeneration was induced by scrotal insulation for 72 hours using disposable diapers. Semen collections were performed before and weekly for 12 weeks using an artificial vagina. Sperm kinetic analysis was performed using a computerized system (CASA), evaluating total motility (TM), progressive motility (PM), and the percentage of rapid spermatozoa (RAP). A significant effect of time was observed for TM, PM, and RAP ($p < 0.05$), with a reduction after scrotal insulation and variations throughout the experimental period, confirming testicular degeneration induced by hyperthermia. No isolated treatment effect was observed ($p > 0.05$). However, a significant interaction between group and time was found for TM and PM ($p < 0.05$), indicating that the variation of these parameters occurred differently between groups, with a greater initial reduction in the control group, especially on day 7 after scrotal insulation, when total motility was approximately 69.5% in the control group and 83.1% in the treated group, and progressive motility was 32.7% in the control and 50.4% in the treated group, followed by gradual recovery over the subsequent weeks. No significant interaction was observed for RAP ($p > 0.05$). Overall, thermal stress promoted transient alterations in sperm kinetics, with partial recovery throughout the experimental period. Pentoxifylline did not alter the overall mean values of the parameters but influenced the temporal pattern of response for total and progressive motility.

Keywords: Heat stress, CASA, Sheep, Semen

Legal authorizations: CEUA/UNESP: n.000.252

Acknowledgments and funders: The author thanks CNPq for the scholarship and CAPES for supporting the graduate program.

Efeitos da Gema de Ovo em Pó nos parâmetros espermáticos avaliados por microscopia convencional de sêmen ovino (*Ovis aries*) após criopreservação

Eduardo de Oliveira Costa¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Mariana Fernandes Souza¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves¹, Natália Borges Miranda¹, Esther Kayla dos Santos Matos¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Universidade Federal da Bahia
E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

A gema de ovo *in natura* (*in*) se consolidou como um dos principais componentes dos meios diluidores, sendo considerada padrão. Sua ação protetora está associada às lipoproteínas de baixa densidade, que preservam a viabilidade e a integridade espermática durante a criopreservação. No entanto, por se tratar de um componente manipulado na forma *in* e perecível, apresenta risco microbiológico, podendo interferir na capacidade fertilizante. Nesse contexto, a gema de ovo em pó surge como uma alternativa viável, sendo microbiologicamente segura e com preservação de suas propriedades bioquímicas. O estudo objetivou avaliar a viabilidade da substituição da gema de ovo *in* pela gema em pó nas concentrações de 5% e 10% nos parâmetros espermáticos criopreservado. Para isso, foram utilizados ejaculados de cinco ovinos mestiços dorper/santa inês, com aproximadamente 1 ano e previamente aprovados em exame andrológico. As coletas foram realizadas por meio de vagina artificial e avaliados de forma individual, sendo posteriormente reunidos em um único *pool* e novamente avaliados. Após avaliações iniciais cada *pool* foi diluído e envasado em palhetas de 0,25 mL com uma concentração de 80×10^6 espermatozoides viáveis, distribuídos em nove grupos experimentais: G0 – gema *in* + Equex 0,5% (controle); G01 – gema *in*+SDS 0,1%; G02 – gema *in*+SDS 0,25%; GP1 – gema pó 5%+Equex 0,5%; GP2 – gema pó 5%+SDS 0,1%; GP3 – gema pó 5%+SDS 0,25%; GP4 – gema pó 10%+Equex 0,5%; GP5 – gema pó 10%+SDS 0,1%; GP6 – gema pó 10%+SDS 0,25%. Os ejaculados foram submetidos à criopreservação e descongelados em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Posteriormente, foram avaliados por microscopia convencional quanto aos parâmetros de motilidade total (MT) e progressiva (MP), vigor, teste supravital (EOS), teste hiposmótico (HOST) e morfologia. Os dados foram processados no software Jamovi (versão 2.3.28.0), incluindo estatística descritiva, verificação de normalidade, avaliação de interação gema–detergente e teste de comparação de médias, com nível de significância de 5%. Não foi observada interação entre os fatores gema e detergente ($p > 0,05$). Os parâmetros cinéticos espermáticos foram significativamente influenciados pelo tipo de gema. A MT (%) foi maior no grupo com gema *in* ($61,67 \pm 7,47$), seguida da gema pó a 10% ($47,83 \pm 14,00$) e da gema pó a 5% ($28,67 \pm 20,83$) ($p < 0,001$). Resultado semelhante foi observado para MP com gema *in*, pó a 10% e a 5% (%) ($50,00 \pm 8,31$; $33,67 \pm 11,89$; $20,27 \pm 18,48$, respectivamente), com diferenças significativas entre todos os grupos ($p < 0,001$). O vigor foi superior na gema *in* ($3,87 \pm 0,35$), enquanto na gema pó a 5% ($2,83 \pm 0,87$) e 10% ($3,10 \pm 0,61$) apresentaram valores inferiores e estatisticamente semelhantes entre si ($p < 0,001$). Na integridade e viabilidade espermática não houve diferença significativa entre os tratamentos para HOST (%) nos grupos gema *in*, gema pó a 5% e gema pó a 10% ($69,40 \pm 18,22$; $69,90 \pm 21,29$; $71,30 \pm 18,93$) e EOS (%) ($58,23 \pm 15,55$; $55,37 \pm 17,42$; $61,83 \pm 15,29$) ($p > 0,05$). Da mesma forma, não foram observadas diferenças para o percentual de espermatozoides morfolologicamente normais (%) ($83,33 \pm 9,01$; $86,50 \pm 8,98$; $84,73 \pm 8,58$) e defeitos menores (%) ($9,37 \pm 7,92$; $8,87 \pm 7,21$; $8,30 \pm 6,95$) ($p > 0,05$). Entretanto, a gema pó a 5% apresentou menor percentual de defeitos maiores (%) ($4,63 \pm 3,23$) em comparação à gema *in* a ($7,30 \pm 2,83$) e à gema pó a 10% ($6,97 \pm 3,63$) ($p = 0,004$). Os resultados demonstram que a gema de ovo em pó a 10% preserva adequadamente a qualidade espermática, apresentando desempenho intermediário em relação à gema *in* e superior à concentração de 5%, atendendo aos padrões mínimos recomendados para sêmen ovino descongelado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Dessa forma, conclui-se que a gema de ovo em pó a 10%, apesar de ser inferior a gema *in*, ainda constitui alternativa viável e segura para a criopreservação de sêmen ovino, mantendo padrões adequados para aplicação em biotecnologias reprodutivas.

Palavras-chave: Liofilização, Congelamento, Motilidade espermática, Gema de ovo

Autorizações legais: Os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, sob o protocolo n°30/2025.

Effects of Egg Yolk Powder on sperm parameters evaluated by conventional microscopy of ovine semen (*Ovis aries*) after cryopreservation

Eduardo de Oliveira Costa¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Mariana Fernandes Souza¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves¹, Natália Borges Miranda¹, Esther Kayla dos Santos Matos¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Universidade Federal da Bahia
E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

Fresh egg yolk (fresh) has established itself as a standard and primary component in extender media, with its protective action attributed to low-density lipoproteins that preserve sperm viability and integrity during cryopreservation. However, as a perishable and manually handled component, it poses a microbiological risk that may interfere with fertilizing capacity. In this context, powdered egg yolk emerges as a viable alternative, being microbiologically safe while preserving its biochemical properties. This study aimed to evaluate the feasibility of substituting fresh yolk with powdered yolk at concentrations of 5% and 10% on cryopreserved sperm parameters. For this purpose, ejaculates from five crossbred Dorper/Santa Inês rams (approximately 1 year old), previously qualified via andrological examination, were utilized. Collections were performed using an artificial vagina and evaluated individually before being pooled and re-evaluated. Following initial assessments, each pool was diluted and packaged in 0.25 mL straws at a concentration of 80×10^6 viable spermatozoa, distributed across nine experimental groups: G0 – fresh yolk + 0.5% Equex (control); G01 – fresh yolk + 0.1% SDS; G02 – fresh yolk + 0.25% SDS; GP1 – 5% powdered yolk + 0.5% Equex; GP2 – 5% powdered yolk + 0.1% SDS; GP3 – 5% powdered yolk + 0.25% SDS; GP4 – 10% powdered yolk + 0.5% Equex; GP5 – 10% powdered yolk + 0.1% SDS; and GP6 – 10% powdered yolk + 0.25% SDS. The ejaculates underwent cryopreservation and were thawed in a water bath at 37°C for 30 seconds. Subsequently, conventional microscopy was employed to evaluate total motility (TM), progressive motility (PM), vigor, supravital test (EOS), hyposmotic swelling test (HOST), and morphology. Data were processed using Jamovi software (version 2.3.28.0), including descriptive statistics, normality verification, yolk–detergent interaction analysis, and mean comparison tests at a 5% significance level. No interaction was observed between the yolk and detergent factors ($p > 0.05$). Sperm kinetic parameters were significantly influenced by the type of yolk. TM (%) was highest in the fresh yolk group (61.67 ± 7.47), followed by 10% powdered yolk (47.83 ± 14.00) and 5% powdered yolk (28.67 ± 20.83) ($p < 0.001$). A similar trend was observed for PM (%) among fresh, 10% powdered, and 5% powdered yolk (50.00 ± 8.31 ; 33.67 ± 11.89 ; 20.27 ± 18.48 , respectively), with significant differences between all groups ($p < 0.001$). Vigor was superior in fresh yolk (3.87 ± 0.35), while 5% (2.83 ± 0.87) and 10% powdered yolk (3.10 ± 0.61) exhibited lower and statistically similar values ($p < 0.001$). Regarding sperm integrity and viability, no significant differences were found for HOST (%) among fresh, 5%, and 10% powdered yolk groups (69.40 ± 18.22 ; 69.90 ± 21.29 ; 71.30 ± 18.93) or for EOS (%) (58.23 ± 15.55 ; 55.37 ± 17.42 ; 61.83 ± 15.29) ($p > 0.05$). Similarly, no differences were observed for the percentage of morphologically normal spermatozoa (%) (83.33 ± 9.01 ; 86.50 ± 8.98 ; 84.73 ± 8.58) and minor defects (%) (9.37 ± 7.92 ; 8.87 ± 7.21 ; 8.30 ± 6.95) ($p > 0.05$). However, 5% powdered yolk presented a lower percentage of major defects (%) (4.63 ± 3.23) compared to fresh (7.30 ± 2.83) and 10% powdered yolk (6.97 ± 3.63) ($p = 0.004$). The results demonstrate that 10% powdered egg yolk adequately preserves sperm quality, exhibiting intermediate performance compared to fresh yolk and superior to the 5% concentration, thus meeting the minimum standards recommended for thawed ovine semen by the Brazilian College of Animal Reproduction. In conclusion, although 10% powdered egg yolk is inferior to fresh yolk, it remains a viable and safe alternative for sheep semen cryopreservation, maintaining adequate standards for application in reproductive biotechnologies.

Keywords: Lyophilization, Freezing, Sperm motility, Egg yolk

Legal authorizations: The procedures were carried out in accordance with the guidelines of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Bahia, under protocol number 30/2025.

Efeitos do Lauril Sulfato de Sódio nos parâmetros espermáticos avaliados por microscopia convencional de sêmen ovino após criopreservação

Eduardo de Oliveira Costa¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves¹, Natália Borges Miranda¹, Maria Clara Costa Freire do Nascimento¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Universidade Federal da Bahia
E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

O uso de substâncias surfactantes ou detergentes desempenha um papel importante na formulação de diluidores para a criopreservação de sêmen, pois atuam sobre a tensão superficial dos líquidos, melhorando a interação entre componentes hidrofílicos e hidrofóbicos. O mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, mas alguns autores sugerem que, durante o processo de criopreservação, os surfactantes atuam tanto nos componentes da gema de ovo quanto nas membranas espermáticas, favorecendo a solubilização dos fosfolípidios e melhorando a permeabilidade. Entretanto, o custo elevado de detergentes comerciais pode tornar o processo de criopreservação mais caro e menos acessível. Nesse contexto, a utilização do Lauril Sulfato de Sódio (SDS) em sua forma pura surge como uma alternativa para redução de custos, mantendo a eficácia do processo e a qualidade espermática após o descongelamento. O estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade da substituição de um agente surfactante comercial pelo SDS. Para isso, o sêmen de cinco ovinos hígdios, previamente aprovados em exame andrológico, foi coletado e os ejaculados foram destinados a formação de *pool* (n=10). Em seguida, o *pool* foi dividido nos nove grupos experimentais e submetido à criopreservação espermática. Os grupos experimentais foram compostos por diluentes a base de Tris-gema-glicerol, sendo: G0 – gema *in natura* + Equex 0,5% (controle); G01 – gema *in natura* + SDS 0,1%; G02 – gema *in natura* + SDS 0,25%; GP1 – gema em pó 5% + Equex 0,5%; GP2 – gema em pó 5% + SDS 0,1%; GP3 – gema em pó 5% + SDS 0,25%; GP4 – gema em pó 10% + Equex 0,5%; GP5 – gema em pó 10% + SDS 0,1%; GP6 – gema em pó 10% + SDS 0,25%. Após descongelamento em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, as amostras foram avaliadas por meio de microscopia convencional para motilidade total e progressiva, vigor, teste supravital (EOS), teste hiposmótico (HOST) e morfologia (coloração de Panótico). Os dados foram processados no software Jamovi (versão 2.3.28.0), incluindo estatística descritiva, verificação de normalidade, avaliação de interação gema–detergente e teste de comparação de médias, com nível de significância de 5%. Não foi observada interação significativa entre gema e detergente, e os efeitos principais do fator detergente foram analisados separadamente, independentemente de estarem com gema *in natura*, em pó 5% ou em pó 10%. A motilidade progressiva (p=0,009) e o vigor (p=0,02) foram significativamente influenciados pelo tipo de detergente, sendo que o SDS a 0,1% (MP%:43,33±10,93 / Vigor:3,57) apresentou resultados semelhantes ou superiores ao detergente comercial (MP%:32,83±16,7 / Vigor: 3,27), e ambos foram superiores ao SDS a 0,25% (MP%:27,77±21,95 / Vigor:2,97). Os demais parâmetros avaliados — motilidade total, HOST, EOS, morfologia normal, defeitos maiores e menores — não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) entre os grupos, indicando que o tipo e a concentração do detergente não comprometeram a integridade e viabilidade espermática. Os resultados demonstram que o SDS a 0,1% mantém os parâmetros mínimos recomendados para sêmen ovino descongelado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, sendo uma alternativa viável, segura e mais econômica ao detergente comercial, adequada para aplicação em biotecnologias da reprodução.

Palavras-chave: Liofilização, Solubilização, Substâncias tensoativas

Autorizações legais: Os procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética de Uso Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia, sob o protocolo n°30/2025.

Effects of Sodium Lauryl Sulfate on sperm parameters of cryopreserved ram semen evaluated by conventional microscopy

Eduardo de Oliveira Costa¹, Isabella de Matos Brandão Carneiro¹, Miguel Ferreira Bonfim Baptista¹, Rodrigo Ribeiro Machado Mendes¹, Sidney Gonçalves Gonzalez Alves¹, Natália Borges Miranda¹, Maria Clara Costa Freire do Nascimento¹, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho¹, Rodrigo Freitas Bittencourt¹

¹Universidade Federal da Bahia
E-mail: m.v.eduardo@outlook.com

The application of surfactants or detergents plays a crucial role in the formulation of extenders for semen cryopreservation as they modulate liquid surface tension, thereby enhancing the interaction between hydrophilic and hydrophobic components. Although the underlying mechanism of action is not yet fully elucidated, it is proposed that surfactants act upon both egg yolk constituents and sperm membranes during cryopreservation, facilitating phospholipid solubilization and enhancing permeability. Nevertheless, the high cost associated with commercial detergents can render the cryopreservation process expensive and less accessible; thus, the use of pure Sodium Lauryl Sulfate (SDS) emerges as a cost-effective alternative that preserves post-thaw sperm quality and process efficacy. This study aimed to evaluate the feasibility of substituting a commercial surfactant with SDS using semen collected from five healthy rams, previously qualified via andrological examination, with ejaculates pooled ($n=10$) and distributed into nine experimental groups based on Tris-egg yolk-glycerol extenders: G0 – fresh yolk + 0.5% Equex (control); G01 – fresh yolk + 0.1% SDS; G02 – fresh yolk + 0.25% SDS; GP1 – 5% egg yolk powder + 0.5% Equex; GP2 – 5% egg yolk powder + 0.1% SDS; GP3 – 5% egg yolk powder + 0.25% SDS; GP4 – 10% egg yolk powder + 0.5% Equex; GP5 – 10% egg yolk powder + 0.1% SDS; and GP6 – 10% egg yolk powder + 0.25% SDS. Following thawing in a water bath at 37°C for 30 seconds, samples were evaluated using conventional microscopy for total and progressive motility, vigor, supravital testing (EOS), hyposmotic swelling test (HOST), and morphology (Panoptic staining). Data were processed using Jamovi software (version 2.3.28.0), encompassing descriptive statistics, normality verification, yolk-detergent interaction analysis, and mean comparison tests at a 5% significance level. No significant interaction between yolk and detergent was observed, and the main effects of the detergent factor were analyzed independently of the yolk source (fresh, 5% powder, or 10% powder). Progressive motility ($p=0.009$) and vigor ($p=0.02$) were significantly influenced by the detergent type, with 0.1% SDS (PM%: 43.33 ± 10.93 ; Vigor: 3.57) yielding results similar or superior to the commercial detergent (PM%: 32.83 ± 16.7 ; Vigor: 3.27), while both outperformed 0.25% SDS (PM%: 27.77 ± 21.95 ; Vigor: 2.97). Other assessed parameters—total motility, HOST, EOS, normal morphology, and major/minor defects—showed no significant differences ($p>0.05$), indicating that detergent type and concentration did not compromise sperm integrity or viability. These results demonstrate that 0.1% SDS maintains the minimum parameters recommended for thawed ovine semen by the Brazilian College of Animal Reproduction, serving as a viable, safe, and more economical alternative to commercial detergents for application in reproductive biotechnologies.

Keywords: Lyophilization, Solubilization, Surfactants

Legal authorizations: Procedures were performed in accordance with the guidelines of the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Bahia, under protocol No. 30/2025.

Impacto do estresse térmico sobre espermatozoides armazenados no epidídimo de carneiros

Marina Belucci Teixeira¹, João Carlos Pinheiro Ferreira¹, Eduardo dos Santos Rossi², Viviane Maria Codognoto¹, Antônio Guilherme Roncada Pupulim¹, Jaqueline Candido de Carvalho¹, Paula Zanin Rattes¹, Eunice Oba¹, Beatrice Mislei³, Guilherme Rizzoto³

¹Universidade Estadual Paulista, ²Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral,

³Università di Bologna

E-mail: marina.belucci@unesp.br

A exposição ao estresse térmico tem severo impacto na produção e reprodução em ruminantes. A manutenção da temperatura testicular entre 3-5 graus abaixo da temperatura corporal é fundamental para produção espermática e função testicular. O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos nocivos do estresse térmico em células espermáticas armazenadas no epidídimo de carneiros. A hipótese utilizada foi de que o estresse térmico causaria redução na motilidade de células espermáticas armazenadas no epidídimo durante o período de exposição a temperatura. Foram utilizados 15 carneiros adultos e com boa qualidade seminal e todos os métodos foram aprovados em comitê de ética. Enquanto 5 animais foram designados ao grupo controle (não-insulados) os outros 10 carneiros foram submetidos a insulação testicular por 24 h (n=5) e 48 h (n=5) utilizando fraldas descartáveis sobrepostas cobrindo os testículos e o cone vascular testicular. Após a exposição ao estresse térmico, os carneiros insulados foram castrados respectivamente às 24 e 48 h enquanto os animais do grupo controle foram castrados de forma randomizada junto dos outros grupos. Imediatamente após as castrações as caudas dos epidídimos foram levadas ao laboratório em PBS a 37 °C. Espermatozoides foram obtidos de cada amostra epididimária via *flushing* retrogrado, sendo imediatamente submetidos a avaliações de motilidade e cinética utilizando sistema CASA, além de preparos com eosina nigrosina para avaliação de morfologia. Todos os resultados foram avaliados através de um teste ANOVA seguido de um teste de Tukey e $P < 0.05$ foi utilizado como indicativo de diferença estatística. A insulação escrotal levou a um aumento de temperatura testicular de ~5 °C já às 24 h sendo mantido valores semelhantes às 48 h, ambos significativamente diferentes do grupo controle ($P < 0.01$). Em relação ao grupo controle o grupo de carneiros insulados apresentou redução aguda dos parâmetros cinéticos motilidade total, motilidade progressiva, LIN, VSL e STR às 24 h ($P < 0,01$; variação de -20% a -40%) que se manteve às 48 h ($P > 0,05$). Já os parâmetros de morfologia normal nos carneiros insulados apresentaram uma redução ($P < 0,01$) de ~ 15 % às 24 h e de ~ 60% às 48 h quando comparados ao grupo controle. Em conclusão, os resultados deste estudo corroboram a hipótese proposta, ao indicar que o estresse térmico não afeta apenas as células espermáticas em formação, mas também células maduras, armazenadas na cauda do epidídimo e prontas para a ejaculação.

Palavras-chave: Temperatura, Epidídimo, Cinética, Célula espermática, Carneiro.

Autorizações legais: (FMVZ – UNESP, Botucatu, SP, Brasil, 041/2021 - CEUA)

Agradecimentos e financiadores:

Agradecemos o apoio obtido através da CAPES (88887.571133/2020-00), FAPESP (2020/15556-6) e CNPq (4153/04/2021), que apoiaram a viabilidade do projeto.

Heat stress impacts on sperm stored in the epididymis in rams

Marina Belucci Teixeira¹, João Carlos Pinheiro Ferreira¹, Eduardo dos Santos Rossi², Viviane Maria Codognoto¹, Antônio Guilherme Roncada Pupulim¹, Jaqueline Candido de Carvalho¹, Paula Zanin Rattes¹, Eunice Oba¹, Beatrice Mislei³, Guilherme Rizzoto³

¹Universidade Estadual Paulista, ²Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral, ³Università di Bologna
E-mail: marina.belucci@unesp.br

Exposure to heat stress in ruminants has a severe impact on production and reproduction. Maintaining testicular temperature within 3-5 degrees below body temperature is fundamental for sperm production and testicular function. The objective of this work was to investigate the harmful effects of thermal stress in the sperm cells stored in the caput of the epididymis. We hypothesized that heat stress causes reduction in the motility of the sperm cells in the epididymis during the heat exposure period. A total of 15 adult and reproductively sound rams were used in this experiment and all methods utilized were approved by the ethics committee. A group of 5 rams were allocated to the control group (no insulated) whereas the 10 other animals were exposed to testicular insulation for 24 hours (n=5) or 48 hours (n=5) using disposable diapers covering the testicles and the vascular testicular cone. Following heat stress exposure, the insulated rams were castrated at 24 or 48 h, respectively. Control animals were castrated randomly alongside the other groups. Immediately after castration, the epididymal tails were transported to the laboratory in phosphate-buffered saline (PBS) at 37 °C. Spermatozoa were recovered from each epididymal sample by retrograde flushing and immediately evaluated for motility and kinetic parameters using a CASA system. Additionally, eosin–nigrosine smears were prepared for morphological assessment. Scrotal insulation resulted in an increase in testicular temperature of approximately 5 °C after 24 h, with similar values maintained at 48 h; both were significantly higher than those observed in the control group (P < 0.01). In comparison with the control group, the insulated rams presented acute decrease in sperm kinetics values, including total and progressive motility LIN, VSL and STR at 24 h (P < 0,01; varying from -20% to 40%), which was maintained at 48 h (P > 0,05). Both insulated groups differed significantly from the control group. Regarding the normal morphology in the insulated rams, reductions were observed at 24 h (~15%; P < 0.01) and 48 h (~60%; P < 0.01) when compared to the control group. In conclusion, the results obtained in this study corroborate with the proposed hypothesis, since it demonstrates that heat stress does not only damages developing germ cells but also affects mature spermatozoa that are ready for ejaculation and stored in the cauda epididymis.

Keywords: Temperature, Epididymides, Kinetics, Sperm cell, Ram.

Legal authorizations: (FMVZ – UNESP, Botucatu, SP, Brazil, 041/2021 - CEUA)

Acknowledgments and funders:

We are grateful for the support obtained via CAPES (88887.571133/2020–00), FAPESP (2020/15556–6) and CNPQ (4153/04/2021), that supported the viability of the project.

Influência da sazonalidade sobre os parâmetros espermáticos de carneiros da raça White Dorper (*Ovis aries*)

Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Kemilly Dayane Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Karen Monise França da Luz¹, Taísa de Andrade Rocha¹, Wanessa Blaschi¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: lindaaurea9@gmail.com

Ovinos White Dorper são amplamente utilizados em sistemas de produção ovina no Brasil, devido à sua boa adaptação a climas quentes, precocidade sexual, habilidades maternas e qualidade de carcaça, características que tornam essa raça promissora para as biotecnologias da reprodução. Entretanto, há poucos estudos sobre a influência da sazonalidade na qualidade seminal em regiões subtropicais, o que dificulta um planejamento reprodutivo apropriado. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da sazonalidade em parâmetros espermáticos de carneiros da raça White Dorper mantidos em clima subtropical úmido, comparando dados obtidos nos períodos de inverno (IN) e primavera (PR). Foram utilizados cinco (N=5) carneiros White Dorper, com 12 meses de idade, hípidos e com parâmetros reprodutivos dentro da normalidade, mantidos na Fazenda Escola da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), no município de Bandeirantes, Paraná. O local apresenta clima subtropical úmido, segundo a classificação de Köppen (23° 06' 36" Sul e 50° 22' 04" Oeste). A colheita de sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação, sendo realizadas duas colheitas por período experimental (inverno e primavera). Após a colheita, os ejaculados foram submetidos a uma pré-diluição na proporção 1:1 (sêmen:diluidor) em extensor comercial para sêmen refrigerado (Botubov®- Botupharma), isento de glicerol, na temperatura de 36°C. As amostras foram avaliadas quanto ao volume, cinemática espermática, morfologia e integridade de membrana plasmática. A análise da cinemática espermática foi realizada por sistema computadorizado (ISPERM®), com o *setup* configurado para a espécie ovina. Para as análises de morfologia e integridade de membrana plasmática, foi preparado um esfregaço a partir da mistura de 3µL do sêmen com 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital- Botupharma®). As variáveis analisadas incluíram porcentagem de espermatozoides normais, defeitos maiores e menores, integridade de membrana plasmática, motilidade total e progressiva, velocidade média do trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento de cauda (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Quando a distribuição foi normal, as comparações entre os dois períodos sazonais (inverno e primavera) foram realizadas pelo teste t pareado. Para dados não paramétricos, utilizou-se o teste de Wilcoxon para amostras pareadas. O nível de significância adotado foi de 5%. Com base nos resultados, não foram observadas diferenças significativas entre as estações quanto à porcentagem de espermatozoides normais (IN: 93,20% vs. PR: 89,80%; P = 0,261), defeitos maiores (IN: 2,20% vs. PR: 2,60%; P = 0,789) e menores (IN: 4,60% vs. PR: 5,60%; P = 0,647), bem como para a motilidade total (IN: 88,00% vs. PR: 83,00%; P = 0,199) e motilidade progressiva (IN: 55,20% vs. PR: 50,20%; P = 0,491). Entretanto, a integridade da membrana plasmática foi superior no inverno (IN: 98,20% vs. PR: 85,20%; P = 0,010). Da mesma forma, os parâmetros de cinemática espermática, incluindo VAP (IN: 83,00 µm/s vs. PR: 69,20 µm/s; P = 0,027), VCL (IN: 145,00 µm/s vs. PR: 122,60 µm/s; P = 0,014) e BCF (IN: 25,20 Hz vs. PR: 21,00 Hz; P = 0,036), também foram superiores no inverno, enquanto STR, LIN e ALH não apresentaram diferenças entre os períodos. Assim, conclui-se que houve diferenças entre os períodos sazonais avaliados na qualidade espermática de carneiros da raça White Dorper. Na região estudada, o inverno apresentou melhores resultados em comparação à primavera, reforçando a importância de considerar a variação entre estações do ano no planejamento reprodutivo de ovinos em regiões subtropicais, a fim de otimizar os índices de fertilidade e a eficiência dos programas reprodutivos.

Palavras-chave: andrologia, cinemática espermática, fertilidade, ovino, biotecnologias reprodutivas.

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/UENP: 12/2023).

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem a Fundação Araucária pelo apoio à pesquisa.

Influence of seasonality on the sperm parameters of sheep of White Dorper breed (*Ovis aries*)

Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Kemilly Dayane Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Karen Monise França da Luz¹, Taísa de Andrade Rocha¹, Wanessa Blaschi¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: lindaaurea9@gmail.com

White Dorper rams are widely used in sheep production systems in Brazil due to their good adaptation to hot climates, early sexual maturity, maternal ability, and carcass quality, characteristics that make this breed promising for artificial insemination programs and semen collection for cryopreservation. However, there are few studies evaluating the influence of seasonality on the seminal quality of White Dorper rams in subtropical regions, which hinders proper reproductive planning. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of seasonality on sperm parameters of White Dorper rams maintained under a humid subtropical climate, comparing data obtained during winter (IN) and spring (PR). Five (n = 5) White Dorper rams, aged 12 months, clinically healthy and with normal reproductive parameters, were used. The animals were maintained at the Experimental Farm of the State University of Northern Paraná (UENP), located in the municipality of Bandeirantes, Paraná, Brazil. The region is classified as humid subtropical according to Köppen (23° 06' 36" S and 50° 22' 04" W). Semen collection was performed using the electroejaculation technique, with two semen collections performed in each experimental period (winter and spring). After collection, ejaculates were pre-diluted at a 1:1 ratio (semen:extender) using a commercial extender for cooled semen (glycerol-free, Botubov® – Botupharma) at 36 °C. The samples were evaluated for volume, sperm kinematics, morphology, and membrane integrity. Sperm kinematics were analyzed using a computerized system (ISPERM®) with settings configured for the ovine species. For morphology and plasma membrane integrity analyses, smears were prepared by mixing 3 µL of semen with 3 µL of supravital eosin-nigrosin stain (BotuVital® – Botupharma). The analyzed variables included percentage of normal spermatozoa, major and minor defects, plasma membrane integrity, total and progressive motility, average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), lateral head amplitude (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), and linearity (LIN). Data were subjected to the Shapiro–Wilk normality test. When data were normally distributed, comparisons between the two seasonal periods (winter and spring) were performed using a paired t-test. For non-parametric data, the Wilcoxon signed-rank test for paired samples was applied. The significance level was set at 5%. Based on the results, no significant differences were observed between seasons for the percentage of normal spermatozoa (IN: 93.20% vs. PR: 89.80%; P = 0.261), major defects (IN: 2.20% vs. PR: 2.60%; P = 0.789), minor defects (IN: 4.60% vs. PR: 5.60%; P = 0.647), total motility (IN: 88.00% vs. PR: 83.00%; P = 0.199), and progressive motility (IN: 55.20% vs. PR: 50.20%; P = 0.491). However, plasma membrane integrity was higher in winter (IN: 98.20% vs. PR: 85.20%; P = 0.010). Similarly, sperm kinematic parameters, including VAP (IN: 83.00 µm/s vs. PR: 69.20 µm/s; P = 0.027), VCL (IN: 145.00 µm/s vs. PR: 122.60 µm/s; P = 0.014), and BCF (IN: 25.20 Hz vs. PR: 21.00 Hz; P = 0.036), were also higher in winter, while STR, LIN, and ALH showed no differences between periods. Thus, it can be concluded that differences were observed between the evaluated seasonal periods in the sperm quality of White Dorper rams. In the studied region, winter showed better results compared to spring, reinforcing the importance of considering seasonal variation in reproductive planning for sheep in subtropical regions in order to optimize fertility rates and the efficiency of reproductive programs.

Keywords: andrology, sperm kinematics, fertility, sheep, reproductive biotechnologies

Legal authorizations: The study was approved by the Ethics Committee on the use of Animals (CEUA/UENP: 12/2023).

Acknowledgments and funders: The authors thank the Araucaria foundation for supporting the research.

Influência do tempo de armazenamento a 15°C sobre os parâmetros espermáticos de sêmen heterospérmico de carneiros da Raça Dorper (*Ovis aries*)

Luís Fernando Geraldo¹, Karen Monise França da Luz¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: luisfgeraldo6090@gmail.com

A ovinocultura tem registrado crescimento significativo no Brasil, ampliando a demanda por biotécnicas reprodutivas voltadas ao melhoramento genético e à eficiência produtiva. Nesse contexto, o uso de sêmen heterospérmico destaca-se como uma ferramenta útil para comparar a fertilidade entre reprodutores sob condições ambientais semelhantes, reduzindo a influência de fatores externos. Além disso, configura-se como uma estratégia promissora para aumentar as taxas de concepção, considerando possíveis diferenças na viabilidade espermática entre ejaculados distintos. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de armazenamento a 15°C sobre os parâmetros espermáticos do sêmen heterospérmico de carneiros da raça Dorper, buscando a viabilidade do uso da refrigeração para conservação e utilização do material genético. Foram utilizados cinco (N=5) carneiros White Dorper, com 12 meses de idade, hípidos e com parâmetros reprodutivos dentro da normalidade. A colheita de sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação. Após a colheita, os ejaculados foram submetidos a uma pré-diluição na proporção 1:1 em extensor comercial para sêmen refrigerado (isento de glicerol, Botubov®- Botupharma) na temperatura de 36°C. Para cada dois carneiros, os ejaculados previamente diluídos foram combinados em partes iguais, formando uma amostra heterospérmica composta por 50% de cada ejaculado. Em seguida, essas amostras foram rediluídas até atingir a concentração final de 100×10^6 spz/palhaeta. Ao todo, foram obtidas 10 combinações heterospérmicas. As amostras foram avaliadas quanto ao volume, cinemática espermática, morfologia e integridade de membrana. A análise da cinemática espermática foi realizada por sistema computadorizado (ISPERM®) com o *setup* configurado para a espécie ovina. Para as análises de morfologia e integridade de membrana plasmática, foi preparado um esfregaço a partir da mistura de 3µL do sêmen com 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital- Botupharma®). Os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA de medidas repetidas, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que a motilidade total manteve-se estável até 24 h, reduzindo-se a partir de 36 h (0h: $81,2 \pm 1,67a$; 12h: $78,1 \pm 1,55a$; 24h: $71,5 \pm 1,76a$; 36h: $61,6 \pm 2,96b$; 48h: $47,1 \pm 4,02c$; 60h: $13,9 \pm 1,2d$; $P < 0,05$) e motilidade progressiva foi preservada até 36 h, com declínio a partir de 48 h (0h: $39,8 \pm 2,85a$; 12h: $38,6 \pm 2,34a$; 24h: $37,9 \pm 3,29a$; 36h: $31,9 \pm 3,15a$; 48h: $23,1 \pm 2,79b$; 60h: $3,0 \pm 0,29c$; $P < 0,05$). A velocidade média do trajeto (VAP- 0h: $72,27 \pm 3,17a$; 12h: $76,1 \pm 1,88a$; 24h: $75,3 \pm 2,80a$; 36h: $60,6 \pm 1,21ab$; 48h: $61,1 \pm 1,15ab$; 60h: $46,0 \pm 1,52b$; $P < 0,05$) velocidade curvilínea (VCL- 0h: $143,1 \pm 3,65a$; 12h: $138,8 \pm 3,22a$; 24h: $134,9 \pm 6,14a$; 36h: $113,6 \pm 2,72ab$; 48h: $114,3 \pm 2,03ab$; 60h: $92,0 \pm 4,15b$; $P < 0,05$) e velocidade retilínea (VSL- 0h: $49,5 \pm 2,61a$; 12h: $55,1 \pm 2,89a$; 24h: $57,3 \pm 2,87a$; 36h: $46,3 \pm 1,42ab$; 48h: $47,2 \pm 1,29ab$; 60h: $30,6 \pm 1,72c$; $P < 0,05$) apresentaram diminuição significativa a partir de 36 h. Em relação a morfologia espermática, o percentual de defeitos maiores (0h: $2,2 \pm 0,51a$; 12h: $2,4 \pm 0,30a$; 24h: $2,9 \pm 0,45a$; 36h: $3,1 \pm 0,31a$; 48h: $3,6 \pm 0,34a$; 60h: $4,0 \pm 0,69b$; $P < 0,05$) e menores (0h: $2,9 \pm 0,40a$; 12h: $4,0 \pm 0,33a$; 24h: $4,4 \pm 0,34a$; 36h: $4,9 \pm 0,60a$; 5,3 $\pm 0,94a$; 60h: $7,9 \pm 1,15$; $P < 0,05$) se mantiveram inalterados até 48 h, com aumento apenas em 60 h. A integridade de membrana apresentou maior comprometimento após 36h (0h: $96,9 \pm 0,31a$; 12h: $96,8 \pm 0,30a$; 24h: $96,4 \pm 0,33a$; 36h: $89,7 \pm 0,93ab$; 48h: $81,6 \pm 1,23b$; 60h: $72,1 \pm 1,95b$; $P < 0,05$). Em conclusão, a refrigeração a 15 °C é uma estratégia viável para o uso de sêmen ovino em curto prazo em biotécnicas como inseminação artificial. Contudo, períodos superiores a 36h comprometem a viabilidade espermática, exigindo planejamento logístico.

Palavras-chave: andrologia, cinemática espermática, fertilidade, ovino, biotecnologias reprodutivas

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/UENP: 12/2023)

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem a Fundação Araucária pelo apoio à pesquisa.

Influence of storage time at 15°C on sperm parameters of heterospermic semen from Dorper rams (*Ovis aries*)

Luis Fernando Geraldo¹, Karen Monise França da Luz¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: luisfgeraldo6090@gmail.com

Sheep production has experienced significant growth in Brazil, increasing the demand for reproductive biotechnologies aimed at genetic improvement and production efficiency. In this context, the use of heterospermic semen stands out as a useful tool to compare fertility among sires under similar environmental conditions, minimizing the influence of external factors. Additionally, it represents a promising strategy to improve conception rates, considering possible differences in sperm viability among distinct ejaculates. The objective of this study was to evaluate the influence of storage time at 15 °C on the sperm parameters of heterospermic semen from Dorper rams, aiming to assess the feasibility of refrigeration for the preservation and use of genetic material. Five (N = 5) White Dorper rams, 12 months old, clinically healthy and with normal reproductive parameters, were used. Semen collection was performed by electroejaculation. After collection, the ejaculates were pre-diluted (1:1; semen:diluent) in a commercial extender for chilled semen (glycerol-free, Botubov® – Botupharma) at 36 °C. For each pair of rams, the previously diluted ejaculates were combined in equal proportions, forming a heterospermic sample composed of 50% from each ejaculate. These samples were then re-diluted to reach a final concentration of 100×10^6 spermatozoa per straw. In total, 10 heterospermic combinations were obtained. Samples were evaluated for volume, sperm kinematics, morphology, and membrane integrity. Sperm kinematics analysis was performed using a computerized system (ISPERM®) with settings adjusted for the ovine species. For morphology and plasma membrane integrity, smears were prepared by mixing 3 µL of semen with 3 µL of eosin/nigrosin supravital stain (BotuVital® – Botupharma). Data were analyzed using repeated measures ANOVA, with a significance level of 5%. The results showed that total motility remained stable up to 24 h, decreasing from 36 h onward (0 h: 81.2 ± 1.67^a ; 12 h: 78.1 ± 1.55^a ; 24 h: 71.5 ± 1.76^a ; 36 h: 61.6 ± 2.96^b ; 48 h: 47.1 ± 4.02^c ; 60 h: 13.9 ± 1.2^d ; $P < 0.05$), while progressive motility was maintained up to 36 h, with a decline from 48 h onward (0 h: 39.8 ± 2.85^a ; 12 h: 38.6 ± 2.34^a ; 24 h: 37.9 ± 3.29^a ; 36 h: 31.9 ± 3.15^a ; 48 h: 23.1 ± 2.79^b ; 60 h: 3.0 ± 0.29^c ; $P < 0.05$). The average path velocity (VAP), curvilinear velocity (VCL), and straight-line velocity (VSL) showed a significant decrease from 36 h onward. Regarding sperm morphology, the percentages of major and minor defects remained stable up to 48 h, increasing only at 60 h. Membrane integrity showed greater impairment after 36 h ($P < 0.05$). In conclusion, refrigeration at 15 °C is a viable strategy for the short-term use of ovine semen in reproductive biotechnologies such as artificial insemination. However, storage periods longer than 36 h compromise sperm viability, requiring appropriate logistical planning.

Keywords: andrology, sperm kinematics, fertility, sheep, reproductive biotechnologies

Legal authorizations: The study was approved by the Ethics Committee on the use of Animals (CEUA/UENP: 12/2023)

Acknowledgments and funders: The authors thank the Araucaria foundation for supporting the research

Influência do tempo de armazenamento a 15° sobre os parâmetros espermáticos de carneiros da raça White Dorper (*Ovis aries*)

Kemilly Dayene Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Karen Monise França da Luz¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: kemillydayene@gmail.com

A ovinocultura está em expansão no Brasil, demandando estratégias que aumentem a eficiência reprodutiva e as taxas de prenhez. Nesse contexto, a refrigeração do sêmen ovino destaca-se como alternativa promissora, pois reduz o metabolismo espermático, prolonga a viabilidade celular e facilita o transporte e a utilização do material genético entre propriedades. Este estudo objetivou avaliar a influência do tempo de armazenamento a 15 °C sobre os parâmetros espermáticos de carneiros da raça Dorper, submetidos a seis tempos experimentais T0, T12, T24, T36, T48 e T60 horas. Foram utilizados cinco (n=5) carneiros Dorper com idade de 12 meses e foram incluídos no estudo, apenas animais hígidos e com parâmetros reprodutivos dentro da normalidade. Para a colheita do sêmen, realizou-se a higienização prévia do prepúcio, contenção e colheita pelo método de eletroejaculação. Após a colheita, os ejaculados foram submetidos a uma pré-diluição na proporção 1:1 (sêmen: diluidor) em extensor comercial para sêmen refrigerado (isento de glicerol, Botubov®- Botupharma) em temperatura de 36°C. Em seguida, o sêmen foi rediluído para ajuste da concentração espermática (100 x 10⁶ spz/dose). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml, identificadas e distribuídas nos 6 tempos. Após análise espermática a fresco (volume, cinemática espermática, morfologia e integridade de membrana), as amostras foram armazenadas a 15 °C em caixa de transporte BotuFLEX®. (Seguindo a recomendações do fabricante para curva de refrigeração a 15°C). A cinemática espermática foi realizada por sistema computadorizado (ISPERM®) com o *setup* configurado para a espécie ovina. Para as análises de morfologia e integridade de membrana plasmática, foi preparado um esfregaço a partir da mistura de 3µL do sêmen com 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital-Botupharma®). Após cinco minutos, procedeu-se a leitura em microscópio óptico (100x, imersão), contabilizando-se 200 células por lâmina. Ao final de cada período de armazenamento, as amostras foram reaquecidas em banho-maria a 36 °C/3 minutos e reavaliadas. A análise estatística foi realizada por ANOVA de medidas repetidas (P < 0,05). Os resultados indicaram que houve redução progressiva da qualidade espermática em função do tempo de armazenamento. A integridade de membrana (IM) manteve-se estável entre 0 h, 12 h e 24 h (0h: 98,2 ± 0,20; 12h: 97,0 ± 0,31; 24h: 96,6 ± 0,74; P > 0,05), mas apresentou declínio após 48 h (81,0 ± 3,11; P < 0,001). A motilidade total (MT) e progressiva (MP) apresentaram redução progressiva ao longo das avaliações (P < 0,001). Os maiores valores foram observados no tempo de 0 h e 12 h (MT 0h: 88,0 ± 2,02; MT 12h: 78,0 ± 3,28) (MP 0h: 55,6 ± 4,56; MP 12h: 46,0 ± 5,16) comparado a 24 h e 36 h (MT 24h: 71,6 ± 4,05; MT 36h: 66,6 ± 3,01) (MP 24h: 41,2 ± 3,89; MP 36h: 35,2 ± 4,42); com queda significativa para MT a partir de 48 h (52,2 ± 3,41; P < 0,001) e MP a partir de 60h (4,6 ± 1,66; P < 0,001). Em relação aos parâmetros de velocidade média do trajeto (VAP) e velocidade progressiva (VSL), o tempo 0h diferiu de 12 h, 24 h e 36 h (VAP 0h: 88,8 ± 4,14; VAP 12h: 78,8 ± 3,62; VAP 24h: 71,6 ± 1,20; VAP 36h: 66,4 ± 2,89; P < 0,001) (VSL 0h: 75,6 ± 3,45; VSL 12h: 62,4 ± 5,3; VSL 24h: 52,2 ± 2,76; VSL 36h: 50,2 ± 2,35; P < 0,001) e apresentou valores superiores aos de 48 h (VAP: 62,6 ± 2,11; VSL: 46,0 ± 2,14; P < 0,001) e 60 h (VAP: 50,4 ± 2,50; VSL: 38,0 ± 1,81; P < 0,001). O VCL seguiu padrão semelhante, com os maiores valores em 0 h e 12 h, 24 h e 36 h, (0h: 145,0 ± 9,42; 12h: 136,0 ± 6,7; 24h: 144,6 ± 7,5; 36h: 130,2 ± 7,2; P < 0,001) e quedas significativas em 48 h (48h: 118,2 ± 4,48; P < 0,001) e 60 h (95,0 ± 4,39; P < 0,001). Em conclusão, a refrigeração a 15 °C é viável para curtos períodos, sendo útil no transporte de sêmen e biotecnologias reprodutivas; porém, armazenamentos superiores a 48 horas comprometem a qualidade seminal, exigindo planejamento logístico adequado.

Palavras-chave: Biotecnologia reprodutiva, cinemática espermática, refrigeração, ovinos.

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/UENP – 012/2023).

Agradecimentos e financiadores: Agradeço aos professores e colegas que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, pelo apoio, orientação e troca de conhecimento ao longo dessa trajetória.

Influence of storage time at 15°C on the sperm parameters of Dorper rams (*Ovis aires*)

Kemilly Dayene Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Karen Monise França da Luz¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: kemillydayene@gmail.com

Sheep production is expanding in Brazil, requiring strategies to improve reproductive efficiency and pregnancy rates. In this context, refrigeration of ram semen stands out as a promising alternative, as it reduces sperm metabolism, prolongs cell viability, and facilitates the transport and use of genetic material between farms. This study aimed to evaluate the influence of storage time at 15 °C on the sperm parameters of Dorper rams, subjected to six experimental time points: T0, T12, T24, T36, T48, and T60 hours. Five (n = 5) 12-month-old Dorper rams were used, and only clinically healthy animals with normal reproductive parameters were included. Semen collection was performed after prior preputial hygiene, physical restraint, and electroejaculation. After collection, ejaculates were pre-diluted at a 1:1 ratio (semen:diluent) using a commercial extender for refrigerated semen (glycerol-free, Botubov® – Botupharma) at 36 °C. Subsequently, semen was further diluted to adjust sperm concentration (100 × 10⁶ spermatozoa/dose). Samples were packaged in 0.5 mL straws, identified, and distributed across the six time points. After fresh semen evaluation (volume, sperm kinetics, morphology, and membrane integrity), samples were stored at 15 °C in a BotuFLEX® transport box, following the manufacturer's recommendations for the cooling curve. Sperm kinetics were assessed using a computerized system (ISPERM®), configured for ovine species. For morphology and plasma membrane integrity analyses, smears were prepared by mixing 3 µL of semen with 3 µL of eosin/nigrosin supravital stain (BotuVital® – Botupharma). After five minutes, slides were examined under a light microscope (100×, oil immersion), counting 200 cells per slide. At the end of each storage period, samples were rewarmed in a water bath at 36 °C for 3 minutes and reevaluated. Statistical analysis was performed using repeated measures ANOVA (P < 0.05). Results showed a progressive decline in sperm quality over storage time. Membrane integrity (MI) remained stable between 0 h, 12 h, and 24 h (0 h: 98.2 ± 0.20; 12 h: 97.0 ± 0.31; 24 h: 96.6 ± 0.74; P > 0.05), but decreased after 48 h (81.0 ± 3.11; P < 0.001). Total motility (TM) and progressive motility (PM) decreased progressively over time (P < 0.001), with higher values at 0 h and 12 h (TM 0 h: 88.0 ± 2.02; TM 12 h: 78.0 ± 3.28; PM 0 h: 55.6 ± 4.56; PM 12 h: 46.0 ± 5.16), compared to 24 h and 36 h (TM 24 h: 71.6 ± 4.05; TM 36 h: 66.6 ± 3.01; PM 24 h: 41.2 ± 3.89; PM 36 h: 35.2 ± 4.42), with a significant decline in TM from 48 h onward (52.2 ± 3.41; P < 0.001) and in PM from 60 h (4.6 ± 1.66; P < 0.001). Regarding velocity parameters, average path velocity (VAP) and straight-line velocity (VSL) at 0 h differed from 12 h, 24 h, and 36 h (VAP 0 h: 88.8 ± 4.14; 12 h: 78.8 ± 3.62; 24 h: 71.6 ± 1.20; 36 h: 66.4 ± 2.89; P < 0.001; VSL 0 h: 75.6 ± 3.45; 12 h: 62.4 ± 5.3; 24 h: 52.2 ± 2.76; 36 h: 50.2 ± 2.35; P < 0.001), with higher values compared to 48 h (VAP: 62.6 ± 2.11; VSL: 46.0 ± 2.14; P < 0.001) and 60 h (VAP: 50.4 ± 2.50; VSL: 38.0 ± 1.81; P < 0.001). Curvilinear velocity (VCL) followed a similar pattern, with higher values at 0 h, 12 h, 24 h, and 36 h (0 h: 145.0 ± 9.42; 12 h: 136.0 ± 6.7; 24 h: 144.6 ± 7.5; 36 h: 130.2 ± 7.2; P < 0.001), and significant decreases at 48 h (118.2 ± 4.48; P < 0.001) and 60 h (95.0 ± 4.39; P < 0.001). In conclusion, refrigeration at 15 °C is suitable for short-term storage and is useful for semen transport and reproductive biotechnologies; however, storage periods longer than 48 hours compromise semen quality, requiring proper logistical planning.

Keywords: Reproduction biotechnology, sperm kinematics, refrigeration, sheep

Legal authorizations: The study was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA/UENP – 012/2023).

Acknowledgments and funders: I would like to thank the professors and colleagues who contributed to the development of this project, for their support, guidance, and exchange of knowledge throughout this journey.

Influência do tempo de armazenamento a 5° C sobre os parâmetros espermáticos de carneiros da raça White Dorper (*Ovis aries*)

Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Karen Monise França da Luz¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹, Myrian Megumi Tsunokawa Hidalgo¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: mariapaulabap@hotmail.com

A ovinocultura tem apresentado crescimento significativo no Brasil, o que impulsiona a demanda por biotecnologias reprodutivas que promovam o melhoramento genético e a eficiência produtiva. Assim, a refrigeração e a criopreservação de sêmen destacam-se como alternativas práticas para o transporte e a utilização em programas de inseminação artificial. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência do tempo de armazenamento a 5 °C sobre os parâmetros espermáticos de carneiros da raça Dorper, submetidos a seis tempos experimentais T0, T12, T24, T36, T48 e T60 horas. Para isso, foram utilizados ejaculados de cinco (n=5) carneiros White Dorper com idade de 12 meses, hígdidos e previamente aprovados em exame andrológico. A colheita de sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação. Após a colheita, os ejaculados foram submetidos a uma pré-diluição na proporção 1:1 (sêmen:diluidor) em extensor para sêmen Bovino (isento de glicerol, Botubov®- Botupharma) em temperatura de 36°C. Em seguida, o sêmen foi rediluído para ajuste da concentração espermática (100 x 10⁶ spz/mL). As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, identificadas e distribuídas de forma equitativa nos 6 tempos experimentais. Após a análise espermática a fresco (volume, cinemática espermática, morfologia e integridade de membrana), foram armazenadas a 5°C em caixa de transporte BotuFLEX®, sendo cada caixa destinada a um tratamento. A análise da cinemática espermática foi realizada por sistema computadorizado (ISPERM®) com o *setup* configurado para a espécie ovina. Para as análises de morfologia e integridade de membrana plasmática, foi preparado um esfregaço a partir da mistura de 3µL do sêmen com 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital- Botupharma®). Após cinco minutos, procedeu-se a leitura em microscópio óptico (100x, imersão), contabilizando-se 200 células por lâmina. Ao final de cada período de armazenamento, as amostras foram reaquecidas em banho-maria a 36 °C/3 minutos e reavaliadas. Os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA de medidas repetidas, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que o percentual de defeitos maiores (0h: 2,2 ± 1,24; 12h: 3,0 ± 0,83; 24h: 2,6 ± 0,40; 36h: 3,8 ± 0,66; 48h: 2,0 ± 0,44; 60h: 2,0 ± 0,31; P=0,561) e menores (0h: 4,6 ± 0,81; 12h: 4,6 ± 0,67; 24h: 4,0 ± 1,14; 36h: 3,6 ± 0,67; 48h: 4,0 ± 0,63; 60h: 4,4 ± 0,81; P=0,911) mantiveram-se estáveis durante todo o período de 60 h. Em contrapartida, a integridade de membrana apresentou estabilidade até 24 horas com queda significativa após 48 horas (0h: 98,2 ± 0,20; 12h: 97,8 ± 0,31; 24h: 96,6 ± 0,74; 36h: 92,0 ± 0,54; 48h: 81,0 ± 3,11; 60h: 73,4 ± 1,12; P < 0,05). A motilidade total (0h: 88,0 ± 2,02; 12h: 78,0 ± 3,28; 24h: 71,6 ± 4,05; 36h: 66,6 ± 3,01; 48h: 52,2 ± 3,41; 60h: 18,6 ± 1,99) e progressiva (0h: 55,6 ± 4,56; 12h: 46,0 ± 5,16; 24h: 41,2 ± 3,89; 36h: 35,2 ± 4,42; 48h: 27,8 ± 2,99; 60h: 4,6 ± 1,66) mantiveram-se satisfatória até aproximadamente 24–36 h, com declínio após 48 horas P < 0,05). Em relação a velocidade média do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL) e a velocidade curvilínea (VCL), esses parâmetros de cinemática também apresentaram redução significativa ao longo do tempo: VAP (0h: 88,8 ± 4,14; 12h: 78,8 ± 3,62; 24h: 71,6 ± 1,20; 36h: 66,4 ± 2,89; 48h: 62,6 ± 2,11; 60h: 50,4 ± 2,50; P=0,004), VSL (0h: 75,6 ± 3,45; 12h: 62,4 ± 5,30; 24h: 52,2 ± 2,76; 36h: 50,2 ± 2,35; 48h: 46,0 ± 2,14; 60h: 38,0 ± 1,81; P=0,029) e VCL (0h: 145,0 ± 9,42; 12h: 136,0 ± 6,70; 24h: 144,6 ± 7,50; 36h: 130,2 ± 7,20; 48h: 118,2 ± 4,48; 60h: 95,0 ± 4,39; P=0,002). Portanto, conclui-se que a refrigeração a 5°C é eficaz na conservação do sêmen ovino por até 48 horas, sendo uma alternativa viável para transporte e aplicação em biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial, sobretudo em regiões com acesso restrito à criopreservação.

Palavras-chave: Refrigeração, biotecnologia reprodutiva, cinemática espermática, ovino.

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/UENP – 012/2023).

Agradecimentos e financiadores: Agradeço aos professores e colegas que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto, pelo apoio, orientação e valiosa troca de conhecimentos ao longo desta trajetória.

Influence of storage time at 5° C on the sperm parameters in Dorper rams (*Ovis aries*)

Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Karen Monise França da Luz¹, Wanessa Blaschi¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros¹, Myrian Megumi Tsunokawa Hidalgo¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: mariapaulabap@hotmail.com

Sheep production has shown significant growth in Brazil, driving the demand for reproductive biotechnologies that promote genetic improvement and productive efficiency. Thus, semen refrigeration and cryopreservation stand out as practical alternatives for transport and use in artificial insemination programs. This study aimed to evaluate the influence of storage time at 5 °C on the sperm parameters of Dorper rams subjected to six experimental time points: T0, T12, T24, T36, T48, and T60 hours. For this purpose, ejaculates from five (n = 5) White Dorper rams, 12 months old, clinically healthy and previously approved by breeding soundness examination, were used. Semen collection was performed by electroejaculation. After collection, ejaculates were pre-diluted at a 1:1 ratio (semen:diluent) using a commercial bovine semen extender without glycerol (Botubov®, Botupharma) at 36 °C. Subsequently, semen was rediluted to adjust sperm concentration to 100 × 10⁶ spermatozoa/mL. Samples were packaged in 0.5 mL straws, properly identified, and equally distributed among the six experimental time points. After fresh semen evaluation (volume, sperm kinetics, morphology, and membrane integrity), samples were stored at 5 °C in BotuFLEX® transport boxes, with each box assigned to a specific treatment. Sperm kinetics were analyzed using a computerized system (ISPERM®), configured for the ovine species. For morphology and plasma membrane integrity analysis, smears were prepared by mixing 3 µL of semen with 3 µL of eosin-nigrosin supravital stain (BotuVital®, Botupharma). After five minutes, slides were evaluated under light microscopy (100×, oil immersion), counting 200 cells per slide. At the end of each storage period, samples were reheated in a water bath at 36 °C for 3 minutes and re-evaluated. Data were analyzed using repeated measures ANOVA, with a significance level of 5%. The results showed that the percentage of major defects (0h: 2.2 ± 1.24; 12h: 3.0 ± 0.83; 24h: 2.6 ± 0.40; 36h: 3.8 ± 0.66; 48h: 2.0 ± 0.44; 60h: 2.0 ± 0.31; P = 0.561) and minor defects (0h: 4.6 ± 0.81; 12h: 4.6 ± 0.67; 24h: 4.0 ± 1.14; 36h: 3.6 ± 0.67; 48h: 4.0 ± 0.63; 60h: 4.4 ± 0.81; P = 0.911) remained stable throughout the 60-hour period. In contrast, membrane integrity remained stable up to 24 hours, followed by a significant decline after 48 hours (0h: 98.2 ± 0.20; 12h: 97.8 ± 0.31; 24h: 96.6 ± 0.74; 36h: 92.0 ± 0.54; 48h: 81.0 ± 3.11; 60h: 73.4 ± 1.12; P < 0.05). Total motility (0h: 88.0 ± 2.02; 12h: 78.0 ± 3.28; 24h: 71.6 ± 4.05; 36h: 66.6 ± 3.01; 48h: 52.2 ± 3.41; 60h: 18.6 ± 1.99) and progressive motility (0h: 55.6 ± 4.56; 12h: 46.0 ± 5.16; 24h: 41.2 ± 3.89; 36h: 35.2 ± 4.42; 48h: 27.8 ± 2.99; 60h: 4.6 ± 1.66) remained satisfactory up to approximately 24–36 hours, with a significant decline after 48 hours (P < 0.05). Regarding sperm kinetics, average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), and curvilinear velocity (VCL) also showed a significant reduction over time: VAP (P = 0.004), VSL (P = 0.029), and VCL (P = 0.002). In conclusion, refrigeration at 5 °C is effective for preserving ovine semen for up to 48 hours, representing a viable alternative for transport and application in reproductive biotechnologies such as artificial insemination, especially in regions with limited access to cryopreservation.

Keywords: Refrigeration, reproduction biotechnology, sperm kinematics, sheep.

Legal authorizations: The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CEUA/UENP – 012/2023).

Acknowledgments and funders: I would like to thank the professors and colleagues who contributed to the development of this project, for their support, guidance, and exchange of knowledge throughout this journey.

Influência do tempo de armazenamento a 5°C sobre os parâmetros espermáticos de sêmen heterospérmico de carneiros da Raça Dorper (*Ovis aries*)

Thales Ricardo Rigo Barreiros¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Karen Monise França da Luz¹, Wanessa Blaschi¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: thalesrigo@uenp.edu.br

A ovinocultura tem apresentado expressivo crescimento no Brasil o que intensifica a demanda por biotécnicas reprodutivas voltadas ao melhoramento genético e ao aumento da eficiência produtiva. Assim, o uso do sêmen heterospérmico destaca-se como uma ferramenta para comparação da fertilidade entre reprodutores sob as mesmas condições ambientais, minimizando a influência de fatores externos e uma estratégia promissora para aumentar as chances de concepção em virtude de possíveis diferenças na viabilidade dos espermatozoides de diferentes ejaculados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do tempo de armazenamento a 5°C sobre os parâmetros espermáticos de sêmen heterospérmico de carneiros da raça Dorper, buscando a viabilidade do uso da refrigeração para conservação e utilização do material genético. Foram utilizados cinco (N=5) carneiros White Dorper, com 12 meses de idade, hígidos e com parâmetros reprodutivos dentro da normalidade. A colheita de sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação. Após a colheita, os ejaculados foram submetidos a uma pré-diluição na proporção 1:1 em extensor comercial para sêmen refrigerado (isento de glicerol, Botubov®- Botupharma Biotecnologia Animal) em temperatura de 36°C. Para cada dois carneiros, os ejaculados previamente diluídos foram divididos em duas amostras de mesmo volume, que posteriormente foram combinadas, originando uma amostra heterospérmica composta por metade do volume de cada ejaculado inicial. Em seguida, as amostras foram novamente diluídas até atingir a concentração final de 100×10^6 espermatozoides/palheta. Ao todo, foram obtidas 10 combinações heterospérmicas. As amostras foram avaliadas quanto ao volume, cinemática espermática, morfologia e integridade de membrana. A análise da cinemática espermática foi realizada por sistema computadorizado (ISPERM®, Aidmics Biotechnology - Taiwan) com o *setup* configurado para a espécie ovina. Para as análises de morfologia e integridade de membrana plasmática, foi preparado um esfregaço a partir da mistura de 3µL do sêmen com 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital- Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil). As variáveis analisadas incluíram porcentagem de espermatozoides normais, defeitos maiores e menores, integridade de membrana plasmática, motilidade total e progressiva, velocidade média do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento de cauda (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Os dados foram submetidos à análise estatística por ANOVA de medidas repetidas, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que o percentual de defeitos menores se manteve estável até 24h, com aumento progressivo a partir de 36h (0h: $3,0 \pm 0,36a$; 12h: $3,4 \pm 0,40a$; 24h: $4,3 \pm 0,65a$; 36h: $5,4 \pm 0,67ab$; 48h: $6,6 \pm 1,47ab$; 60h: $7,8 \pm 1,59b$; $P < 0,05$). A integridade de membrana manteve-se estável até 24 h (0h: $96,8 \pm 0,32a$; 12h: $96,8 \pm 0,30a$; 24h: $93,8 \pm 0,75a$; 36h: $90,8 \pm 1,47ab$; $P > 0,05$), com maior proporção de lesões após 48 h (48h: $79,4 \pm 1,62c$; 60h: $74,30 \pm 1,97d$; $P < 0,05$). Entre os parâmetros cinemáticos, a velocidade média do trajeto (VAP) (0h: $75,2 \pm 2,65a$; 12h: $73,2 \pm 2,28a$; 24h: $72,1 \pm 1,70a$; 36h: $67,3 \pm 1,85ab$; 48h: $60,6 \pm 1,19ab$; 60h: $56,8 \pm 1,90b$), velocidade progressiva (VSL) (0h: $58,8 \pm 2,50a$; 12h: $54,2 \pm 2,72a$; 24h: $51,5 \pm 2,85a$; 36h: $51,3 \pm 2,44ab$; 48h: $45,4 \pm 1,30ab$; 60h: $42,9 \pm 1,77b$) e velocidade curvilínea (VCL) (0h: $139,3 \pm 2,93a$; 12h: $135,8 \pm 2,72a$; 24h: $131,5 \pm 2,72a$; 36h: $127,7 \pm 2,61ab$; 48h: $118,7 \pm 2,22ab$; 60h: $109,7 \pm 4,8b$) apresentaram redução a partir de 36h ($P < 0,05$). Em conclusão, a refrigeração a 5 °C é uma estratégia viável para o uso de sêmen ovino em curto prazo para biotécnicas como a inseminação artificial. Contudo, períodos superiores a 48 h comprometem a qualidade seminal, exigindo planejamento logístico.

Palavras-chave: andrologia, cinemática espermática, fertilidade, ovino, biotecnologias reprodutivas

Autorizações legais: O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA/UENP: 12/2023).

Agradecimentos e financiadores: Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio à pesquisa.

Influence of storage time at 5 on sperm parameters of heterospermic semen from Dorper rams (*Ovis aries*)

Thales Ricardo Rigo Barreiros¹, Maria Fernanda de Oliveira Souza¹, Linda Áurea De Souza Ratier Dias¹, Kemilly Dayene Bergamo¹, Maria Paula Pelinzel Baptista¹, Dyana Muniz Carvalho¹, Karen Monise França da Luz¹, Wanessa Blaschi¹, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹

¹Universidade Estadual do Norte do Paraná
E-mail: thalesrigo@uenp.edu.br

Sheep farming has shown significant growth in Brazil, increasing the demand for reproductive biotechnologies aimed at genetic improvement and enhanced productive efficiency. In this context, the development of new approaches, as well as the application of techniques that enable the dissemination of genetic progress, is essential. Thus, the use of heterospermic semen stands out as a tool for comparing fertility between breeders under the same environmental conditions, minimizing the influence of external factors and a promising strategy to increase the chances of conception due to possible differences in sperm viability from different ejaculates. Therefore, this study aimed to evaluate the influence of storage time at 5 °C on the sperm parameters of heterospermic semen from Dorper rams, assessing the feasibility of refrigeration for the preservation and use of genetic material. Five (n = 5) White Dorper rams, aged 12 months, clinically healthy and with normal reproductive parameters, were used. Semen collection was performed using the electroejaculation technique. After collection, ejaculates were pre-diluted at a 1:1 ratio in a commercial extender for cooled semen (glycerol-free, Botubov® – Botupharma Animal Biotechnology) at 36 °C. For each pair of rams, the previously diluted ejaculates were divided into two equal-volume samples and subsequently combined, generating a heterospermic sample composed of equal contributions from each ejaculate. The samples were then further diluted to achieve a final concentration of 100 × 10⁶ spermatozoa per straw. A total of 10 heterospermic combinations were obtained. Samples were evaluated for volume, sperm kinematics, morphology, and membrane integrity. Sperm kinematics were analyzed using a computerized system (ISPERM®, Aidmics Biotechnology – Taiwan), with settings configured for the ovine species. For morphology and plasma membrane integrity analyses, smears were prepared by mixing 3 µL of semen with 3 µL of supravital eosin-nigrosin stain (BotuVital® – Botupharma, Botucatu, SP, Brazil). The analyzed variables included percentage of normal spermatozoa, major and minor defects, plasma membrane integrity, total and progressive motility, average path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR), and linearity (LIN). Data were analyzed using repeated measures ANOVA, with a significance level of 5%. The results demonstrated that the percentage of minor defects remained stable up to 24 h, with a progressive increase from 36 h onward (0h: 3.0 ± 0.36a; 12h: 3.4 ± 0.40a; 24h: 4.3 ± 0.65 a; 36h: 5.4 ± 0.67 ab; 48h: 6.6 ± 1.47 ab; 60h: 7.8 ± 1.59 b; P < 0.05). Membrane integrity remained stable up to 24 h (0h: 96.8 ± 0.32a; 12h: 96.8 ± 0.30a; 24h: 93.8 ± 0.75a; 36h: 90.8 ± 1.47ab; P > 0.05), with a higher proportion of damage observed after 48 h (48h: 79.4 ± 1.62c; 60h: 74.30 ± 1.97 d; P < 0.05). Among the kinematic parameters, average path velocity (VAP) 0h: 75.2 ± 2.65a; 12h: 73.2 ± 2.28a; 24h: 72.1 ± 1.70a; 36h: 67.3 ± 1.85ab; 48h: 60.6 ± 1.19ab; 60h: 56.8 ± 1.90b), straight-line velocity (VSL) (0h: 58.8 ± 2.50a; 12h: 54.2 ± 2.72a; 24h: 51.5 ± 2.85a; 36h: 51.3 ± 2.44ab; 48h: 45.4 ± 1.30ab; 60h: 42.9 ± 1.77b), and curvilinear velocity (VCL) (0h: 139.3 ± 2.93a; 12h: 135.8 ± 2.72a; 24h: 131.5 ± 2.72a; 36h: 127.7 ± 2.61ab; 48h: 118.7 ± 2.22ab; 60h: 109.7 ± 4.80b) showed a decline from 36 h onward (P < 0.05). In conclusion, refrigeration at 5°C is a viable strategy for the short-term use of ram semen in biotechniques such as artificial insemination. However, periods exceeding 48 hours compromise semen quality, requiring logistical planning.

Keywords: andrology, sperm kinematics, fertility, sheep, reproductive biotechnologies

Legal authorizations: The study was approved by the Ethics Committee on the use of Animals (CEUS/UENP: 12/2023).

Acknowledgments and funders: The authors thank the Araucaria foundation for supporting the research.

O extrato hidroetanólico de gengibre melhora a atividade mitocondrial de espermatozoides ovinos pós-criopreservação?

Lucas dos Santos Andrade¹, Matheus Soares da Silva Melo¹, Alan Rocha dos Santos Silva², Felype da Silva Medeiros², Isaac de Almeida e Silva², José Rafael de Oliveira Andrade², Maria do Rosário Araújo dos Santos², Pedro Marinho dos Santos Júnior², Valdir Moraes de Almeida², Sildivane Valcácia Silva¹

¹Universidade Federal da Paraíba, ²Universidade Federal de Campina Grande
E-mail: andradest.vet@gmail.com

A criopreservação do sêmen ovino ainda apresenta limitações à biotecnologia da produção animal, principalmente em função da redução da viabilidade espermática pós-descongelamento. O retorno ao metabolismo promovido pela descongelamento induz os espermatozoides ao estresse oxidativo, resultante da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, que supera a capacidade antioxidante celular. Nesse contexto, o gengibre (*Zingiber officinale*) destaca-se pelo seu potencial antioxidante e pela possibilidade de contribuir para a preservação da funcionalidade espermática pós-descongelamento. A enzima citocromo c oxidase é um marcador crucial da integridade da cadeia respiratória mitocondrial, podendo ser avaliada pelo teste de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações do extrato de gengibre como aditivo em um diluidor comercial a base de lipossoma (Optidux®) na atividade mitocondrial espermática. Os rizomas de gengibre foram submetidos à extração utilizando solução hidroalcoólica de etanol a 70% como solvente. O extrato ficou em solução por 72 horas e, em seguida, foi filtrado e teve o solvente retirado com auxílio de um evaporador rotativo para aquisição do extrato bruto. Para a formação dos grupos experimentais, foi realizado o preparo de uma solução-mãe deste extrato, que foi adicionada ao diluidor Optidux® para a concentração final de extrato de gengibre de: 0 mg/mL (GC: Grupo Controle, sem adição de extrato); 50 µg/mL (G1); 100 µg/mL (G2) e 200 µg/mL (G3). As coletas do sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial, com a utilização de três reprodutores ovinos da raça Santa Inês e o sêmen, quando aprovado, foi submetido à formação de um pool, dividido em quatro alíquotas de igual volume e diluídas nos grupos experimentais supracitados, na concentração de 400 x 10⁶ espermatozoides/mL. O protocolo de criopreservação foi automatizado (TK-3000®), sendo a curva de refrigeração realizada por redução de -0,25 °C/min, partindo-se da temperatura ambiente (30 °C) até atingir 5 °C, seguido de um período de duas horas de estabilização térmica (período de equilíbrio). A curva de congelamento reduziu -20 °C/min (de 5 °C a -120 °C), seguida de armazenamento em nitrogênio líquido (-196 °C). Foram realizadas dez repetições deste procedimento. Pós-descongelamento (37 °C por 30 s), a atividade da citocromo c oxidase foi mensurada via técnica de DAB, em microscópio óptico de campo claro. Os espermatozoides foram categorizados de I (alta atividade) a IV (ausência de atividade), conforme a deposição de coloração amarronzada na peça intermediária. O Índice de Atividade Citoquímica (IAC) foi calculado mediante aplicação de fatores de correção específicos (I: 1,0; II: 0,5; III: 0,25; IV: 0), sendo o IAC a soma das atividades I, II e III. Os dados foram processados no software Statistica 64, utilizando-se os testes de Shapiro-Wilk (normalidade) e homogeneidade, seguidos de ANOVA e pós-teste de Tukey (p<0,05). Os grupos apresentaram os seguintes valores de IAC (média±erro padrão): GC (60,76%±2,35), G1 (59,07%±2,25), G2 (56,39%±3,36) e G3 (59,72%±2,59). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais para o índice de atividade citoquímica, ou seja, a adição do extrato não teve efeito sobre a atividade mitocondrial. Por outro lado, os dados obtidos demonstram que a adição do extrato de gengibre não foi deletério aos espermatozoides submetidos à criopreservação, no entanto, o extrato não é capaz de promover melhora significativa em relação ao diluidor à base de lipossoma quanto à atividade mitocondrial. Futuros estudos, com diferentes concentrações do extrato de gengibre, podem ser realizados para otimizar a criopreservação de sêmen ovino.

Palavras-chave: antioxidante, congelamento, lipossoma, mitocôndria

Autorizações legais: Autorização legal: CEUA/UFCG: protocolo N° 36/2025

Agradecimentos e financiadores: Agradecimentos: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Does hydroethanolic ginger extract improve mitochondrial activity in sheep sperm after cryopreservation?

Lucas dos Santos Andrade¹, Matheus Soares da Silva Melo¹, Alan Rocha dos Santos Silva², Felype da Silva Medeiros², Isaac de Almeida e Silva², José Rafael de Oliveira Andrade², Maria do Rosário Araújo dos Santos², Pedro Marinho dos Santos Júnior², Valdir Moraes de Almeida², Sildivane Valcácia Silva¹

¹Universidade Federal da Paraíba, ²Universidade Federal de Campina Grande
E-mail: andradest.vet@gmail.com

Cryopreservation of ram semen still presents limitations to animal production biotechnology, mainly due to the reduction in sperm viability after thawing. The return to metabolic activity triggered by thawing subjects spermatozoa to oxidative stress, resulting from the excessive production of reactive oxygen species, which overwhelms the cells' antioxidant capacity. In this context, ginger (*Zingiber officinale*) stands out for its antioxidant potential and its ability to contribute to the preservation of sperm function after thawing. The enzyme cytochrome c oxidase is a crucial marker of mitochondrial respiratory chain integrity and can be assessed using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) assay. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of different concentrations of ginger extract as an additive in a commercial liposome-based diluent (Optidux®) on sperm mitochondrial activity. The ginger rhizomes were extracted using a 70% ethanol hydroalcoholic solution as the solvent. The extract was left in solution for 72 hours, then filtered, and the solvent was removed using a rotary evaporator to obtain the crude extract. To form the experimental groups, a stock solution of this extract was prepared and added to the Optidux® diluent to achieve final ginger extract concentrations of: 0 mg/mL (CG: Control Group, without extract addition); 50 µg/mL (G1); 100 µg/mL (G2); and 200 µg/mL (G3). Semen collections were performed using an artificial vagina with three Santa Inês breed rams, and the semen, once approved, was pooled into four aliquots of equal volume and diluted into the aforementioned experimental groups at a concentration of 400×10^6 spermatozoa/mL. The cryopreservation protocol was automated (TK-3000®), with the cooling curve performed at a rate of $-0.25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, starting from room temperature ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) until reaching $5 \text{ }^\circ\text{C}$, followed by a two-hour period of thermal stabilization (equilibrium period). The freezing curve was $-20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ (from $5 \text{ }^\circ\text{C}$ to $-120 \text{ }^\circ\text{C}$), followed by storage in liquid nitrogen ($-196 \text{ }^\circ\text{C}$). This procedure was repeated ten times. After thawing ($37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 30 s), cytochrome c oxidase activity was measured using the DAB technique. Spermatozoa were categorized from I (high activity) to IV (no activity) based on the presence of brownish staining in the midpiece. The Cytochemical Activity Index (CAI) was calculated by applying specific correction factors (I: 1.0; II: 0.5; III: 0.25; IV: 0), and the IAC presented is the sum of activities I, II, and III. The data were analyzed using Statistica 64 software, employing the Shapiro-Wilk test (normality) and homogeneity test, followed by ANOVA and Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$). The groups presented the following IAC values (mean±standard error): GC ($60.76\% \pm 2.35$), G1 ($59.07\% \pm 2.25$), G2 ($56.39\% \pm 3.36$), and G3 ($59.72\% \pm 2.59$). No difference was observed between the experimental groups for the cytochemical activity index; that is, the addition of the extract had no effect on mitochondrial activity. On the other hand, the data obtained demonstrate that the addition of ginger extract was not detrimental to spermatozoa subjected to cryopreservation; however, the extract is not capable of promoting a significant improvement over the liposome-based diluent in terms of mitochondrial activity. Future studies using different concentrations of ginger extract could be conducted to optimize the cryopreservation of ram semen.

Keywords: antioxidant, freezing, liposome, mitochondria.

Legal authorizations: Legal authorization: CEUA/UFCG: protocol number 36/2025.

Acknowledgments and funders:

Acknowledgments: This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001