Anais da

Reunião Anual da

V ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

VIRTUAL

ABRIL 2021

ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MATO GROSSO DO SUL

REITOR
Marcelo Augusto Santos Turine

VICE-REITORA
Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo

Obra aprovada pelo
CONSELHO EDITORIAL DA UFMS
Resolução nº 23 - COED/AGECOM/UFMS,
de 19 de abril de 2021.

CONSELHO EDITORIAL
Rose Mara Pinheiro (presidente)
Além-Mar Bernardes Gonçalves
Alessandra Borgo
Ana Rita Coimbra Motta de Castro
Antonio Conceição Paranhos Filho
Antonio Hilario Aguilera Urquiza
Cristiano Costa Argemon Vieira
Delasnieve Miranda Daspet de Souza
Elisângela de Souza Loureiro
Elizabete Aparecida Marques
Geraldo Alves Damasceno Junior
Marcelo Fernandes Pereira
Maria Lígia Rodrigues Macedo
Rosana Cristina Zanelatto Santos
Vladimir Oliveira da Silveira

Projeto Gráfico, Editoração Eletrônica
Secretaria da Editora UFMS

A revisão linguística e ortográfica
é de responsabilidade dos autores

Direitos exclusivos
para esta edição

editora UFMS

Secretaria da Editora UFMS
Av. Costa e Silva, s/nº | Bairro Universitário
Campo Grande - MS, 79070-900
Fone: (67) 3345-7203
e-mail: sedit.agecom@ufms.br

Editora associada à

Associação Brasileira das
Editoras Universitárias

ISBN: 978-65-86943-44-3
1ª edição
Formato digital (2021)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Diretoria de Bibliotecas – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal (5. : 2021 : Campo Grande, MS).
Anais da V Reunião Anual da ABRAA[recurso eletrônico] : Associação Brasileira de Andrologia Animal : abril 2021 : virtual / organizadores Alexandre Rossetto Garcia, José Roberto Potiens, Maurício Antonio Silva Peixer. -- Campo Grande, MS : Ed. UFMS, 2021.

Modo de acesso: https://abraa.org.br/index.php/publicacoes/
Textos em português e inglês.
Inclui bibliografias.
ISBN 978-65-86943-44-3

I. Andrologia animal - Congressos. I. Garcia, Alexandre Rossetto. II. Potiens, José Roberto. III. Peixer, Maurício Antonio Silva. IV. Associação Brasileira de Andrologia Animal.

CDD (23) 636.0824

Bibliotecária responsável: Wanderlice da Silva Assis – CRB 1/1279

ORGANIZADORES
Alexandre Rossetto Garcia
José Roberto Potiens
Maurício Antonio Silva Peixer

Anais da

Reunião Anual da V ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

ABRIL 2021

VIRTUAL

Campo Grande - MS
2021

editora UFMS

ORGANIZADORES

Alexandre Rossetto Garcia
Médico-Veterinário
Pesquisador A da Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP

José Roberto Potiens
Médico-Veterinário
Diretor de Produção da Seleon Biotecnologia
Itatinga, SP

Maurício Antonio Silva Peixer
Médico-Veterinário
Diretor da Bio Biotecnologia Animal
Brasília, DF

COMISSÃO ORGANIZADORA
ABRAA - Associação Brasileira de Andrologia Animal

ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

FICHA TÉCNICA

Reunião Anual da
V ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

Campo Grande, Abril de 2021

Comissão Organizadora

PRESIDENTE
Eliane Vianna da Costa e Silva

VICE-PRESIDENTE
Neimar Correa Severo

PRIMEIRA SECRETÁRIA
Teresinha Inês de Assumpção

PRIMEIRA TESOUREIRA
Maria Isabel Mello Martins

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO
Alexandre Rossetto Garcia

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO
José Roberto Potiens

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO
Maurício Antonio Silva Peixer

DIRETORA DE COMUNICAÇÃO E MARKETING
Renata Lançoni

DIRETOR COMERCIAL
Athos de Assumpção Pastore

PRIMEIRO CONSELHEIRO FISCAL
Rubens Paes de Arruda

SEGUNDO CONSELHEIRO FISCAL
Luis Alfredo Garcia Deragon (in memoriam)

TERCEIRO CONSELHEIRO FISCAL
Rodrigo Freitas Bittencourt

CONSELHEIRO FISCAL SUPLENTE
Fernando Galvan

A ABRAA agradece a todos os colegas que voluntariamente atuaram como revisores *ad hoc* da V Reunião Anual (Ano de 2021)

REVISORES *Ad Hoc*

Alessandra Corallo Nicacio
Embrapa Gado de Corte

Alexandre Rossetto Garcia
Embrapa Pecuária Sudeste

André Luís Rios Rodrigues
Universidade Federal Fluminense

Athos de Assumpção Pastore
Androvet

Bianca Damiani Marques Silva
Embrapa Recursos Genéticos

Carlos Frederico Martins
Embrapa Cerrados

Eliane Vianna da Costa e Silva
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Fabio Morato Monteiro
Instituto de Zootecnia-SP

Flavio Antônio Barca Junior
Universidade Norte do Paraná

Gustavo Ferrer Carneiro
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Isabel Candia Nunes da Cunha
Universidade Estadual do Norte Fluminense

Ivo Pivato
Universidade de Brasília

João Carlos Pinheiro Ferreira
Universidade Estadual Paulista

João de Agostini Losano
Universidade de São Paulo

José Antônio Dell`Aqua Junior
Universidade Estadual Paulista

José Roberto Potiens
Seleon Biotecnologia

Lílian Kátia Ximenes Silva
Universidade da Amazônia

Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis
Universidade Federal de Mato Grosso

Marcilio Nichi
Universidade de São Paulo

Margot Alves Nunes Dode
Embrapa Recursos Genéticos

Maria Isabel Mello Martins
Universidade de Londrina

Maurício Antonio Silva Peixer
Bio Biotecnologia Animal

Mayra Elena Ortiz D´Avila Assumpção
Universidade de São Paulo

Neimar Correa Severo
Revivah Consultoria

Patricia Furtado Malard
Blo Cell Terapia Celular

Priscila Reis Kahwage
Exército do Brasil

Regina Celia Rodrigues da Paz
Universidade Federal de Mato Grosso

Renata Lançoni
Universidade Federal de Uberlândia

Renata Simões
Universidade Federal do ABC

Rodrigo Freitas Bittencourt
Universidade Federal da Bahia

Rubens Paes de Arruda
Universidade de São Paulo

Silvio Renato Oliveira Menegassi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sony Dimas Bicudo
Universidade Estadual Paulista

Teresinha Inês Assumpção
Universidade Federal de Uberlândia

Thais Rose dos Santos Hamilton
Universidade de São Paulo

Apresentação

Caros Congressistas,

Cordiais Saudações!

Somos uma Associação cientifica de médicos veterinários que atuam em pesquisa, ensino, prestação de serviços, preservação e comercialização de material genético, abrangendo a Andrologia Animal em todas suas espécies. Completamos Seis anos de existência e, apesar das dificuldades, crescemos em número de sócios e em público. Nossas Lives têm reunido profissionais interessados nos diversos temas da andrologia e no bom debate técnico-científico.

A V Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal-ABRAA avança em 2021 para a internacionalização e a inovação. Passamos um período difícil para todos, permeado por perdas de entes queridos, amigos e colegas de nosso círculo de convívio. Mas, das dúvidas e reflexões, surgem as superações. Tivemos, por isso, que redescobrir maneiras de interagir, de nos apoiar, de nos abraçar e de aprender no mundo virtual.

A ABRAA compreendeu as dificuldades desse novo tempo e procurou oferecer em 2021 um evento com cenário em 3D, interativo e acolhedor, que nos aproximasse de alguma forma. Mesmo sem ter que se deslocar, vocês poderão estar conosco, presentes nas plenárias, visitar e interagir nos estandes de nossos parceiros e apoiadores. Poderão, também, assistir aos trabalhos científicos, este ano publicados em vídeo-pôsteres. Esse novo formato desafiou os congressistas, que se superaram e mostraram toda sua criatividade e capacidade de adaptação.

Por fim, vale menção aos Anais da V Reunião, que trazem em formato digital uma síntese da reunião com os trabalhos científicos e as palestras, com nosso já conhecido padrão de qualidade gráfica, o que torna a navegação e leitura muito agradáveis. Neste, há, também, uma palestra especial bilingue, último trabalho assinado por Dr. Luis Alfredo Garcia Deragon (*in memoriam*), sócio-fundador da ABRAA e emérito profissional, a quem homenageamos e agradecemos pela dedicação e colaboração para o engrandecimento da Andrologia Animal brasileira.

Sejam bem-vindos e brindem-se com este passeio pela ciência da Andrologia Animal Brasileira!

Eliane Vianna da Costa e Silva
Presidente da ABRAA

Alexandre Rossetto Garcia
Diretor Técnico Científico

Sumário

Palestras 11

Produção e Comercialização de Sêmen no Brasil – Index ASBIA Abertura de novos mercados para Genética Brasileira 12
Márcio Nery Magalhães Júnior

Impacto do uso de reprodutores e das biotecnologias de sêmen na eficiência da produção de bezerros 14
Urbano G. P. Abreu, Antônio do N. F. Rosa, Juliana C B Silva, Eriklis Nogueira, Juliana Varchaki Portes, Luiz Orcirio F de Oliveira e Dayanna S do N Batista

Mercado de sêmen em suínos: o papel das centrais de inseminação artificial 27
Diego Vilela Alkmin

O papel dos componentes do plasma seminal para elevar a fertilidade de espécies domésticas 32
Fabiana Ferreira de Souza, Caroline Scott e André Maciel Crespilho

Comportamiento sexual del carnero 40
Rodolfo Ungerfeld

MicroRNAs em espermatozoides: origem e seus papéis na fertilidade 47
Maíra Bianchi Rodrigues Alves, Rubens Paes de Arruda, Laura Nataly Garcia-Oliveiros, Juliano Coelho da Silveira, Felipe Perecin e Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Avaliação computadorizada do sêmen: o que o laudo diz? 59
Márcio Menezes Nunes

Bull Sperm Zinc Ion Flux as a Marker for the Acquisition of Fertilization Competency 64
Karl Kerns e Peter Sutovsky

Aspectos reprodutivos e biotecnologias da reprodução de peixes 71
Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley e Thais Maia Torres

Tecnologías de semen en cérvidos 87
Rodolfo Ungerfeld e Julián Santiago-Moreno

Perfil endócrino como ferramenta auxiliar na avaliação reprodutiva de animais domésticos 101
Maria Inês Lenz Souza

Palestra Especial 112

Relações entre defeitos espermáticos e taxas de gestação 113
Luis Alfredo Garcia-Deragon, Neimar Correa Severo, Solange Martins Almeida e João Pedro Brandão Zandonaide

Relationships between sperm defects and pregnancy rates 124
Luis Alfredo Garcia-Deragon, Neimar Correia Severo, Solange Martins Almeida e João Pedro Brandão Zandonaide

Resumos 135

BIOTÉCNICAS E CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

Condicionamento de reprodutores bubalinos para coleta e congelamento de sêmen na propriedade 136
Jaci de Almeida e Osvaldo Almeida Resende

Uso de diferentes diluidores intracelulares na criopreservação de sêmen de jumentos da raça Pêga 141
Leonardo José Campos Jr., Victoria Kanadani Campos Poltronieri, Faider Alberto Castanõ Villadiego, Jurandy Mauro Penitente Filho, Ytalo Galinari Henriques Schuartz, Iara Magalhães Ribeiro e José Domingos Guimarães

A influência do tempo na avaliação da integridade de membrana plasmática em sêmen bovino por meio da coloração eosina-nigrosina 145
Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo, Ana Beatriz Marques de Almeida, Josiana de Fátima Schnitzer e Maria Isabel Mello Martins

Efeito da adição de complexo colesterol-ciclodextrina associado à antocianina e diferentes crioprotetores sobre a qualidade seminal de garanhões 149
Victoria Kanadani Campos Poltronieri, Bruna Waddington de Freitas, Iara Magalhães Ribeiro, Ytalo Galinari Henriques Schuartz e José Domingos Guimarães

Protamine ratio in Nelore bulls of different *in vivo* fertility 154
Carlos Alonso Paco Nagaki, Thais Rose dos Santos Hamilton, Camilla Mota Mendes e Mayra Elena Ortiz D Ávila Assumpção

Fertilidade do sêmen equino congelado com adição de pentoxifilina 158
Felipe Casellatto Antonioli, Carla Patrícia Teodoro de Carvalho, Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Leonardo Batissaco, Rafael Cuel Bortoletto e Rubens Paes de Arruda

Caseinato de sódio no aumento do tempo de equilíbrio para criopreservação de sêmen equino: uma opção à longas distâncias? 162
Wallyson Rafael Machado Santos, Pedro Albuquerque de Lima, Tuana da Cunha Reis, Leonardo De Barros Pessoa, Geraldo Francisco dos Santos Júnior, Sâmara Cristine Costa Pinto, Jair Perez Osório, Luciane Maria Laskoski e Fernando Andrade Souza

Zinc signature and CTC demonstrates that Percoll® does not induce premature sperm capacitation in nellore bulls 166
Julia de Lima Simões, Thais Rose dos Santos Hamilton, Camilla Mota Mendes e Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

Antioxidantes na Criopreservação Seminal de Touros Nelore 170

Fernando de Castro Parizi, Geraldo Francisco dos Santos Júnior, Pedro Albuquerque de Lima, Wallyson Rafael Machado Santos, Jardel Carvalho da Silva, Leonardo De Barros Pessoa, Raí Dasmaceno Eleamen, Sâmara Cristine Costa Pinto, Jair Perez Osório, Luciane Maria Laskoski e Fernando Andrade Souza

Efeito do tempo de coloração da eosina-nigrosina na avaliação da integridade de membrana de espermatozoides equinos 174

Ana Beatriz Marques de Almeida, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo, Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Josiana de Fátima Schinitzer, Beatriz Canabrava Garrido e Maria Isabel Mello Martins

Estimativa de repetibilidade de touros da raça Nelore (*bos indicus*) nas variáveis relacionadas a produção *in vitro* de embriões 178

Marina de Oliveira Silva, Jaine Martelo Pagoto, Luana Gomes Fernandes, Marcelo Sant`Ana Borges, Naiara Nantes Rodrigues, Fabio Morato Monteiro, Yeda Fumie Watanabe, Daniel Carlino Joaquim e Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

Polimorfismo do gene do hormônio do crescimento associado à precocidade sexual em machos jovens Nelore 182

Vitor Miotto Oliveira, Luiz Carlos Cesar da Costa Filho, Fernanda Battistotti Barbosa, Thaynádia Gomes Rios, Herbert Patric Kellermann Cleveland, Gustavo Guerino Macedo, Carlos Alberto Nascimento Ramos e Eliane Vianna da Costa e Silva

Quercetin, Carnosine and Ozone in the cryopreservation of bovine semen 186

Willian Vaniel Alves dos Reis, Mozarth Vieira Junior, Raiza Rocha Pereira, Bianca Rodrigues Acacio, Eliane Vianna da Costa e Silva, Gustavo Guerino Macedo e Breno Fernandes Barreto Sampaio

ANDROLOGIA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Cronologia da incidência de anomalias morfológicas espermáticas em touros búfalos (*Bubalus bubalis*) sob estresse térmico de curta duração 190

Arnaldo Algaranhar Gonçalves, Alexandre Rossetto Garcia, Gabriela Santos da Cruz, Simone do Socorro Damasceno Santos e Otávio Mitio Ohashi

Avaliação da morfometria testicular e dos parâmetros do ejaculado de caprinos da raça Boer 194

Rafaeli Fagá Daniel e Carla Fredrichsen Moya

Relação entre volume da cauda do epidídimo e parâmetros seminais 198

Luis Alfredo Garcia-Deragon, Neimar Correa Severo, Solange Martins Almeida, João Pedro Zandonaide e Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr

Características ecográficas do parênquima testicular de touros mantidos em pastagens de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta em clima tropical 202

Narian Romanello, Andréa do Nascimento Barreto, Marco Antonio de Paula Sousa, Felipe Tonato, Cintia Righetti Marcondes e Alexandre Rossetto Garcia

Condições climáticas e seu reflexo na temperatura escrotal e corporal de touros Nelore 206

Luana Gomes Fernandes, Naiara Nantes Rodrigues, Marcelo Sant`Ana Borges, Marina de Oliveira Silva, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Fabio Morato Monteiro

Terapia Fotodinâmica para tratamento de acropostite em touro: Relato de caso 210

Carla Patricia Teodoro de Carvalho, Fabio Celidonio Pogliani, Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Gabriela Alves Reis, Rafael Cuel Bortoletto, Felipe Casellatto Antonioli e Rubens Paes de Arruda

Qualidade seminal de caprinos jovens experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax* ____ ***214***

Letícia Reis Manólio, Amanda Kassem Samour, Beatriz Eustachio Boarini, Gwennever Camargo Moraes, Maísa Panzani Santos, Sarah Daccach, Viviane Bobadilha Morelli, Alessandra Regina Carrer, Letícia de Castro Fiori, Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto, Guilherme Fazan Rossi, Marcos Rogério André, Rosangela Zacarias Machado, Claudia Cristina Paro de Paz e Lindsay Unno Gimenes

Alternativas farmacológicas para o controle da dor e desconforto associados à eletroejaculação em ovinos ____ **218**

Mariana Karla Francolino da Silva, Leonardo de Almeida Gélio, Kleber da Cunha Peixoto Jr., Eunice Oba, Douglas Anderson de Freitas, Renata Elisa Green e André Maciel Crespilho

New perspectives regarding heat stress impact on fertility of *Nelore* bulls ____ **221**

Guilherme Rizzoto, Henry David Mogollon Garcia, Antônio Guilherme Roncado Pupulim, Eduardo dos Santos Rossi e João Carlos Pinheiro Ferreira

É possível detectar DNA de *Trypanosoma vivax* no sêmen de caprinos jovens infectados experimentalmente? ____ **225**

Lindsay Unno Gimenes, Amanda Kassem Samour, Beatriz Eustachio Boarini, Gwennever Camargo Moraes, Letícia Reis Manólio, Maísa Panzani Santos, Sarah Daccach, Viviane Bobadilha Morelli, Alessandra Regina Carrer, Letícia de Castro Fiori, Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto, Guilherme Fazan Rossi, Claudia Cristina Paro de Paz, Marcos Rogério André e Rosangela Zacarias Machado

Inter-relações entre as características qualitativas dos espermatozoides em bovinos ____ **229**

Teresinha Inês de Assumpção, Neimar Correa Severo, João Pedro Brandão Zandonaide e Gustavo Guerino Macedo

Ultrassonografia testicular identifica touros Nelore superprecoces? ____ **233**

Fernanda Battistotti Barbosa, Luiz Carlos Cesar da Costa Filho, Alini Silva Peixoto, Aline Gomes da Silva, Gustavo Guerino Macedo e Eliane Vianna da Costa e Silva

ANDROLOGIA EM ANIMAIS DE COMPANHIA

***Leishmania infantum* em órgãos e secreções genitais de gatos sorologicamente positivos da região metropolitana de Belo Horizonte-MG** ____ **237**

Júlia Campos Bezerra, Jonas Pereira da Silva Neto, Letícia Tiemi Kyuna, Matheus Queiroz de Souza, Guilherme Rafael Gomide Pinheiro, Ana Carolina Amado Gomes, Demerval Magalhães Guedes Júnior, Maíra Harumi Higa Lage, Danielle Silva Castro Ardison, Pedro Paulo de Abreu Telles, Wagner Luiz Tafuri, Vitor Márcio Ribeiro, Ricardo Toshio Fujiwara e Guilherme Ribeiro Valle

Alterações da morfologia espermática nas diferentes porções do trato reprodutivo de cães ____ **241**

Renata Lançoni, Teresinha Inês Assumpção e Laryssa Lays Araujo de Oliveira

ANDROLOGIA EM ANIMAIS SILVESTRES OU EXÓTICOS

Avaliação andrológica e estudo da microbiota cultivável prepucial em um *Puma concolor* jovem– Relato de caso ____ **245**

Marina Crisley Gondim Rebouças, Caio Sérgio Santos, Herlon Victor Rodrigues Silva, Bruna Farias Brito, Francisco Marlon Carneiro Feijó e Alexandre Rodrigues Silva

Environmental conditions affect the sperm quality of agoutis (*Dasyprocta leporina*) during the dry period of a semiarid region _____ **249**
Maiko Roberto Tavares Dantas, Andréia Maria da Silva, Ana Glória Pereira, Caio Sérgio Santos, João Batista Freire Souza-Junior e Alexandre Rodrigues Silva

Degeneração testicular em veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) Zimmermann, 1780: Relato de caso _____ **253**
Teresinha Inês de Assumpção, Athos de Assumpção Pastore, José Maurício Barbanti Duarte e Caroline Silva Vieira

Palestras

Reunião Anual da

V ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

Produção e Comercialização de Sêmen no Brasil – Index ASBIA
Abertura de novos mercados para Genética Brasileira

Márcio Nery Magalhães Júnior
Presidente ASBIA

Fonte: Associação Brasileira da Inseminação Artificial – ASBIA; CEPEA – Esalq/USP. Elaboração: CEPEA – Esalq/USP

Abstract: Over the last ten years, the Artificial Insemination market grew 146%, from 9.6 million units to 23.7 million. In the same period, the use of technology has advanced in the field, from 8% of the herd to 20% of the national herd of females of reproductive age.

Palavras-chave: IATF, IA, Mercado, Genética.

Introdução

A parceria com o CEPEA/Esalq-USP permitiu uma grande evolução do INDEX ASBIA que cresceu em confiabilidade a medida que os dados são validados em cada etapa do processo de movimentação de sêmen, seja na entrada e na saída do produto. O novo Index ASBIA 2020 coletou as informações de maneira a possibilitar o avanço da estratificação dos dados por município onde sabemos hoje que a IA está presente em 77% deles. O Index ASBIA utilizou 143.325 informações individuais na sua formatação de dados por raça e seguimento e 125.734 informações individuais para elaboração dos dados de estratificação por município. A fonte dos dados são as centrais de produção e comercialização de sêmen, que enviam os dados a cada trimestre para o CEPEA encarregado de consolidar e elaborar o relatório.

ENTRADA DE DOSES DE SÊMEN NO MERCADO

Índice	Período	Total anual
Total importado	2020	10.678.016
	2019	8.813.852
	variação 20/19	21%
Total produzido	2020	14.899.623
	2019	10.940.746
	variação 20/19	36%
Mercado total Brasil	2020	25.577.639
	2019	19.754.598
	variação 20/19	29,5%

SAÍDA DE DOSES DE SÊMEN NO MERCADO

Índice		Período	Total anual
Cliente Final	venda corte	2020	16.327.484
		2019	11.809.024
		variação 20/19	38%
	venda leite	2020	5.248.052
		2019	4.637.717
		variação 20/19	13%
	venda total	2020	21.575.583
		2019	16.436.741
		variação 20/19	31%
Exportação	venda total	2020	528.096
		2019	485.360
		variação 20/19	9%
Prestação de Serviço	venda total	2020	1.621.937
		2019	1.584.724
		variação 20/19	2%
Mercado total Brasil		2020	23.725.584
		2019	18.506.825
		variação 20/19	28,1%

Resultados e Discussão

A tecnologia da Inseminação Artificial está amplamente disseminada no país e a partir de 2007, o desenvolvimento da técnica da IATF foi um catalizador importante e hoje responde por mais de 90% das doses utilizadas em rebanhos de corte. Todos os números apontam

para uma consolidação da genética em torno de poucos grupos raciais, onde o agrupamento Nelore, Angus, Holandês, Jersey, Girolando e Gir respondem por um percentual superior a 95% das doses totais comercializadas.

Considerações finais

O desenvolvimento de uma genética de elevada performance e adaptada aos trópicos coloca o Brasil como importante provedor de genética para grande parte da América Latina e com potencial para atingir outros países localizados nas regiões tropicais e subtropicais. O uso de sêmen sexado é crescente o que demonstra a preocupação em dar mais velocidade ao processo de melhoramento genético.

Os centros de produção e comercialização de sêmen tem acompanhado a demanda do mercado com a constante atualização de suas tecnologias e processos de produção visando garantir a qualidade do produto tanto no aspecto genético quanto no aspecto de fertilidade.

O melhoramento genético possibilita a evolução da eficiência produtiva do rebanho nacional e atua de forma positiva na questão da sustentabilidade econômica e ambiental da pecuária de corte e leite no Brasil.

Referências bibliográficas

Index ASBIA/CEPEA 2020

Impacto do uso de reprodutores e das biotecnologias de sêmen na eficiência da produção de bezerros

Urbano G P Abreu[1]
urbano.abreu@embrapa.br
Antônio do N F Rosa[2]
Juliana C B Silva[1]
Eriklis Nogueira[1]
Juliana Varchaki Portes[3]
Luiz Orcirio F de Oliveira[2]
Dayanna S do N Batista[2]

Abstract: High reproductive efficiency is essential to guarantee sustainable livestock production and a satisfactory economic return for the meat producer. Reproductive biotechnologies and animal breeding play an important role in the livestock economy. These two factors have a long- established relationship between reproductive performance and profitability; consequently, improving reproductive and genetic efficiency will increase profitability. In Brazil, the beef livestock farming is practiced in all states and ecosystems in the country. Regardless of the production system, it is characterized by the predominance of the use of pastures. So beef cattle production systems are very different, with variable results. Advances in reproductive biotechnologies and genetic evaluation in different biomes have enabled the development of production systems with better performance in beef cattle systems.

Keywords: selection; pregnancy rate; animal breeding.

Palavras-chave: seleção; taxa de prenhes; melhoramento genético animal.

Introdução

É por meio da genética e das biotécnicas reprodutivas que o produtor pode aumentar mais rapidamente tanto o número de bezerros produzidos por ano pecuário quanto o peso ao desmame dos bezerros, o que ajuda a direcionar a qualidade do seu produto final [1].

Com todas as estimativas de diferenças esperadas de progênie (DEPs) disponíveis atualmente para produtores comerciais, a seleção de touros deveria ser simples. Tudo o que um produtor precisa fazer é encontrar touros com DEPs que se encaixem no "perfil" certo para determinado sistema de produção. Isso parece fácil. A dificuldade, é claro, vem em se determinar qual deve ser esse "perfil". Logicamente, o touro com o conjunto ideal de DEPs é aquele que maximizará o retorno econômico líquido da atividade no curto, médio e longo prazos, sem incorrer em riscos desnecessários e sem comprometer a sustentabilidade do sistema pecuário.

[1] Embrapa Pantanal.
[2] Embrapa Gado de Corte.
[3] Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Observe que "maximizar retornos" e "risco" são termos econômicos. A seleção de touros não é, portanto, apenas um problema em genética. Pertence mais adequadamente à área em que a genética e a economia se encontram. Selecionar corretamente os touros significa determinar a importância econômica relativa das características, e ponderar as DEPs dos touros de acordo com o sistema de produção e com os aspectos ambientais do local no qual o touro irá ser utilizado.

A utilização do touro em diferentes sistemas exige ainda, o balanço correto entre o *frame* corporal, o peso adulto e a altura dos animais. Além dos aspectos reprodutivos do rebanho no qual o animal (ou o sêmen) será utilizado. Quando você não sabe a resposta para esta questão, existe a possibilidade de conseguir uma resposta com alguém com mais experiência. No contexto da seleção para compra de touros (ou sêmen), isso significa identificar pessoas com conhecimento e escolher o mesmo tipo de touros que eles fazem. Porém há dois problemas nesta abordagem:

· Seu consultor pode não ter mais *insight* do que você; e

· Mesmo que ele faça um bom trabalho de seleção, os touros que forem selecionados para o seu rebanho podem não ser a melhor escolha para o seu sistema produtivo.

As biotécnicas reprodutivas, especialmente as com maior difusão entre os produtores de gado comercial, são essenciais para intensificação sustentável dos rebanhos de cria no Brasil. A inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) são as biotecnologias mais utilizadas no mundo, com o objetivo de aumentar o ganho genético e melhorar a eficiência reprodutiva de rebanhos bovinos. Os protocolos de sincronização da ovulação para IA ou para TE são ferramentas que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de um grande número de embriões em um momento pré-estabelecido (TETF) sem a necessidade de detecção de estro [2].

Seleção e uso de touros/sêmen melhoradores

Na seleção de reprodutores, por exemplo, um tamanho corporal padrão não serve para todos os sistemas. O tipo certo de rebanho (e, portanto, o tipo certo de touro para compor o rebanho com determinado padrão de vaca) só pode ser determinado no contexto de ambientes e práticas de gestão específicas. Dois sistemas podem ser idênticos em termos de ambiente e gerenciamento, mas se os rebanhos forem geneticamente diferentes, o tipo de touro mais adequado para cada sistema pode ser diferente [3].

Trata-se de questão complexa. O método clássico de seleção ideal para mais de uma característica é o índice de seleção (IS) que leva em consideração aspectos genéticos e econômicos. O ponto de partida para criar um índice econômico é a estimativa do valor genético agregado (H), que deve ter forte aderência com o objetivo de seleção dos diferentes sistemas [4].

A equação do valor genético agregado (ou agregado genotípico), de maneira geral, é descrita da seguinte forma:

$$H = v_1 VG_1 + v_2 VG_2 + ... + v_n VG_n$$

onde:

H é a estimativa do mérito genético geral do animal;

VG representam valores genéticos para diferentes características de importância econômica (isto é, DEPs); e

v são pesos econômicos associados a cada característica.

O peso econômico é definido como o valor (geralmente em dólares) do aumento independente de uma unidade (aumento marginal) no desempenho de uma dada característica, sobre o valor total do índice, que pode ser estimado pela aplicação de modelos matemáticos apropriados.

Entretanto estimar valores para pesos econômicos não é um processo trivial. Suponha, por exemplo, que a idade da puberdade seja uma característica incluída no objetivo de seleção. Queremos calcular o valor de um dia de aumento na idade da puberdade em nosso rebanho, independentemente das mudanças no desempenho de todas as outras características do objetivo de criação. Aumento na idade na puberdade, no entanto, é normalmente indesejável, por isso esperamos que esse peso econômico seja negativo, ou seja, que penalize animais mais tardios. Mas quão tardios? Para determinar isso, há necessidade de quantificar como uma mudança na idade da puberdade afeta a receita e os custos do sistema de produção. A idade à puberdade influencia o sistema por seu efeito nas taxas de prenhez das novilhas. Maior número de novilhas precoces prenhes significa mais novilhas selecionadas para reposição.

A idade à puberdade também afeta os custos. Ou seja, quanto mais tardias as novilhas, mais reses estarão por mais tempo na fase de recria, conseguentemente sem gerar receita. As novilhas geneticamente mais precoces e férteis permitem melhor reposição e maior eficiência dos sistemas de produção de cria/recria. Entretanto, por mais lógico que seja esse raciocínio, ele não responde à pergunta. Não indica o valor econômico de uma mudança de um dia a menos na idade à puberdade. Para isso, precisamos conhecer a relação matemática entre a idade à puberdade e a taxa de prenhês em novilhas. Infelizmente, essa (co)variação não é constante - muda com o ambiente e o sistema de produção. E para dificultar a situação, valores genéticos para a idade à puberdade não são tão frequentes e precisos (variável de difícil mensuração).

Por outro lado, temos predições para uma característica relacionada - circunferência escrotal dos irmãos completos e meio irmãos das novilhas. Mas se a circunferência escrotal fosse uma característica do nosso objetivo de criação, precisaríamos conhecer as relações genéticas (variâncias e (co)variância), entre a circunferência escrotal dos irmãos completos e meio irmãos das novilhas e a taxa de prenhês das novilhas para, em seguida, calcular o valor econômico de um aumento de um centímetro na circunferência escrotal. Determinar a importância relativa das características para as quais temos DEPs seria menos difícil, se tivessem impacto econômico direto. Uma DEP para a taxa de prenhês de novilhas, por exemplo, seria mais fácil de trabalhar do que uma DEP para a circunferência escrotal.

Com a estimativa de DEPs para características economicamente relevantes, poderíamos direcionar mais facilmente as características que compõem o objetivo de seleção. Os pesquisadores estão estimando DEPs para diferentes características, mas mesmo que consigam produzir estimativas para todas com significado econômico direto, a ponderação entre as (co)variações

(genéticas e fenotípicas) das características não será uma questão de fácil solução. Ainda devemos levar em consideração a necessidade de estimar com robustez os componentes dos efeitos do manejo, do ambiente e da genética de cada rebanho sob a pressão de seleção.

A metodologia com maior potencial para resolver a questão com todas as variáveis é a de simulação bioeconômica. Os modelos de simulação têm o potencial de combinar, de forma rápida e barata, informações genéticas com variáveis específicas dos sistemas de produção relacionadas ao ambiente, economia e gestão; determinar interações entre esses fatores; e prever o desempenho animal e o lucro da empresa. Os resultados podem ser usados para produzir índices de seleção personalizados, perfis ideais de DEPs e até classificações específicas para compradores de touros oferecidos para venda [5].

Como esses modelos simulam relações biológicas, eles exigem predições genéticas das características biologicamente relevantes. Atualmente, este aspecto vem sendo implementado, mas muito deverá ser feito para maior utilização da tecnologia como suporte para a tomada de decisão com objetivo de selecionar touros ou sêmen para compra para serem utilizados no rebanho de cria.

Os produtores para usufruirem das tecnologias de seleção, por meio de índices de seleção, devem entender como as características a serem selecionadas afetam a lucratividade dos sistemas de produção. Eles devem então ajustar esse entendimento para se adequar às condições específicas do manejo e das características de suas fazendas, para então selecionar os touros conforme todas estas informações conhecidas.

Por outro lado, as alterações de produção e do gerenciamento em uma operação comercial de sistema de cria devem ser monitoradas ao longo do tempo. Para isto, devem ser avaliadas, preferencialmente, por meio de uma equação de lucro, em que se calcula a rentabilidade de longo prazo da fazenda, com os dados de custos e de receitas sendo levados em conta.

No entanto, o trabalho em uma única característica para realizar seleção é um erro. O ideal é uma avaliação global das principais características que impactem positivamente o ganho genético/econômico do sistema de produção. Portanto, a compra de material genético (sêmen, embriões, touros etc.) exige muita reflexão, pois essa decisão afetará a economia da fazenda por anos. Assim a meta da fazenda depende, em larga escala, da escolha correta dos touros, sendo ponto importante na tomada de decisão para o sucesso do empreendimento.

A aquisição de touros para o rebanho de cria é um aspecto extremamente importante na tomada de decisão, pois envolve, além do investimento direto nesta compra, o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho e o progresso genético dos animais. Assim, diferentes aspectos devem ser levados em conta quando da compra ou da seleção destes reprodutores no próprio rebanho. É difícil um touro se destacar em todas as características. Portanto, o produtor comercial ao comprar touros ou sêmen deve considerar vários aspectos, tais como: fertlidade, funcionalidade, características raciais e, principalmente, analisar com cuidado a aderência da avaliaçao genética (réguas de DEPs) dos animais a serem utilizados com as características de seu sistema de produção. Desta forma, o planejamento prévio resultará em uma melhor decisão de compra da qual não se arrependerá no futuro.

Desafio dos sistemas de produção

Avaliações dos sistemas pecuários devem ser consideradas de maneira cuidadosa, pois se trata de segmento importante para alimentação humana. A produção pecuária contribui para 18% do balanço global de alimentos em termos de ingestão calórica diária por pessoa e para 25% do consumo de proteína [6].

Em algumas situações, essa produção pode promover a conservação da biodiversidade, em sistemas integrados e bem manejados capazes de, inclusive, mitigar emissões de metano entérico pela captura e estoque nos solos do carbono da atmosfera, absorvido por fotossíntese. Todos estes aspectos devem ser avaliados em contextos regionais e locais, tanto para o desenvolvimento de programas de pesquisa adequados, bem como para verificar o real impacto ambiental da atividade pecuária. Essas variações devem ser direcionadas para nortear políticas de incentivos e de restrições para desenvolvimento das atividades pecuárias em todo mundo [7]. O aumento da eficiência produtiva e da sustentabilidade da produção de áreas agropecuárias tem sido proposto como uma solução para o conflito entre a expansão da produção pecuária e a conservação de ecossistemas naturais [8].

Estes desafios exigem ação sistêmica em toda a cadeia de produção. Uma resposta tem sido direcionar a produção de bovinos para o aumento da eficiência, de modo a diminuir a pressão sobre o ambiente e, por outro lado, garantir a continuidade dos sistemas de produção. Esta abordagem de "intensificação sustentável (IS)" é um objetivo para grande número de instituições nacionais e internacionais, mas também atrai a crítica como aquela de se estar focando apenas na produção [9]. Há quatro premissas no conceito de IS necessárias para estabelecer as prioridades das ações para implantação desta abordagem na cadeia produtiva da pecuária de corte e que possibilitam analisar as interfaces com outros objetivos do sistema produtivo:

1. Necessidade de aumentar a produção. O desafio de alcançar a segurança alimentar sustentável para todos não é apenas, em parte, um problema do lado da oferta. Outras ações são também urgentes e necessárias tais como a moderação na demanda por alimentos que consomem muitos recursos, a redução do desperdício de alimentos e o desenvolvimento de sistemas de governança, com objetivo de melhorar a eficiência e a resiliência do sistema de produção. O aumento de rendimento em muitos países em desenvolvimento é, atualmente, uma questão crucial. Assim, a IS deve ser vista como estratégia de diferentes frentes para alcançar a segurança alimentar sustentável, ao invés de uma solução abrangente;

2. O aumento da produção deve ser realizado por incorporação de tecnologias direcionadas para maior produtividade - produzir mais com menos, em razão da pouca disponibilidade de terras agricultáveis. Desta forma, podem ser evitados impactos ambientais negativos pela incorporação de florestas e de zonas úmidas, cuja utilização poderia aumentar consideravelmente as emissões de GEE e a perda de biodiversidade e de serviços ecossistêmicos;

3. A segurança alimentar requer atenção tanto para o aumento da sustentabilidade ambiental, como para aumento da produtividade. A IS não significa a produção de alimentos com melhorias marginais em sustentabilidade. A implantação de IS exige repensar a produção

de alimentos para alcançar grandes reduções no impacto ambiental. Em algumas áreas, os aumentos no rendimento são compatíveis com melhorias ambientais, por exemplo, na recuperação de pastagens degradadas. Em outros, reduções de rendimento ou de realocação de terra serão necessárias para garantir a sustentabilidade e proporcionar benefícios tais como a conservação da vida selvagem, armazenamento de carbono, protecção contra inundações e recreação. Um aumento global da produção não quer dizer que os rendimentos médios devem aumentar em todos os lugares ou a qualquer custo. O desafio deve ser enfrentado o contexto de cada local; e

4. IS indica uma meta, mas não especifica *a priori* como deve ser atingida ou quais tecnologias agropecuárias são demandadas para sua implantação. Abordagens convencionais, "hightech", agroecológica ou orgânica devem ser rigorosamente testadas e avaliadas levando- se em conta os contextos sociais, ambientais e econômicos de forma a permitir a formulação de políticas adequadas a cada situação.

Para determinar a importância relativa das características dentro dos diferentes sistemas de produção é fundamental entender como as características individuais influenciam a lucratividade, ou seja, como elas afetam a receita e os custos. Por exemplo, animais adultos mais pesados geralmente resultam em maior receita, quando se considera a unidade animal. Por outro lado, quanto maiores os pesos adultos, maiores os custos de manutenção para vacas e maiores as exigências dos bezerros em relação à alimentação, pois para expressarem o potencial de crescimento há necessidade de maior cuidado com a alimentação pré e pós desmama. Após este entendimento, podemos classificar as caraterísticas nas seguintes categorias: sobrevivência, fertilidade / longevidade, consumo de ração e custos de cada tipo de produto [10].

Características de sobrevivência incluem também aquelas relacionadas à dificuldade de parto, por exemplo. As ligadas à fertilidade / longevidade incluem circunferência escrotal e tempo de permanência (*stayability*). O consumo de ração e dos diferentes tipos de insumos é relacionado às características de peso e carcaça. Os custos não relacionados à alimentação envolvem características associadas à adaptação, ao temperamento e a eficiência alimentar etc. Observa-se que algumas características se encaixam em mais de uma categoria, o que reforça a importância de um objetivo do sistema de produção bem estabelecido e da clara identificação das características prioritárias a serem selecionadas no contexto do aumento da eficiência econômica do sistema.

Nos sistemas de cria, a partir de levantamentos de campo, de maneira geral, ainda são poucos os produtores que controlam os custos de produção e índices zootécnicos. Essa falta de controle acaba por se tornar um grande desafio para a realização de avaliações das variáveis zootécnicas economicamente mais importantes. Entretanto levantamentos deixam claro que nas propriedades com uso de genética superior, onde também é feito acompanhamento financeiro e dos indicadores zootécnicos, os resultados obtidos são bem superiores aos verificados nas propriedades modais. Essa profissionalização administrativa, nitidamente, proporciona uma otimização dos resultados do uso de genética provada. Observa- se que, frequentemente, o uso da tecnologia de avaliações genéticas como suporte ao processo de seleção direciona a

transformação dos sistemas de produção na pecuária de corte, com a adoção de várias outras nas áreas de gestão, nutrição e saúde animal, o que muda positivamente os sistemas [11].

Por meio da análise de dados de sistemas modais de pecuária de cria, utilizando análise de envoltória de dados (DEA) foram realizadas modelagem da eficiência de 21 sistemas modais de produção de gado de corte, na fase de cria. Os dados foram coletados no formato de painéis, oriundos do projeto Indicadores Pecuários desenvolvidos pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) e Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), realizados em municípios de sete estados: Mato Grosso do Sul - MS (oito), Goiás - GO (quatro), Rio Grande do Sul - RS (um), Minas Gerais - MG (quatro), Tocantins - TO (dois), São Paulo - SP (um) e Bahia - BA (um). Sendo cada um destes estados considerado uma DMU (decision making unit). A análise do conjunto de variáveis determinou a seleção das entradas (*inputs*) e saídas (*outputs*) dos sistemas.

Como *input*, foi selecionada a quantidade de reprodutores, já que a variável representa parte significativa dos gastos totais dos pecuaristas que produzem bezerro (15% dos custos diretos), sendo diretamente ligada à qualidade dos animais que serão comercializados nesses sistemas. Esta também é a única categoria animal do rebanho de cria que é adquirida de outros rebanhos, especialmente de fazendas com plantéis de seleção genética.

Como *outputs* foram escolhidos os produtos do sistema que geram as principais receitas da pecuária de cria: a quantidade de bezerros produzidos na propriedade e de vacas de descarte. Todos os bezerros produzidos são vendidos e geram receita. As vacas de descarte são vendidas por serem excluídas do sistema produtivo, seja por idade avançada ou por desempenho reprodutivo inferior ao desejado.

Na fase de cria na pecuária de corte, em função de apresentar maior risco e menor remuneração, os produtores buscam maneiras de ter menores custos de produção, sendo cautelosos em realizar gastos maiores como adquirir reprodutores. Assim, a maioria dos sistemas avaliados trabalha com retornos crescentes à escala e perdem eficiência. Ou seja, poderiam produzir mais e de forma ajustada à escala se investissem em balancear melhor o número e, possivelmente, a qualidade dos reprodutores nos rebanhos de cria [12].

Também por meio de modelagem DEA, com restrições nos pesos, foram propostos dois modelos, segundo os enfoques econômico e socioambiental, para avaliação do desempenho dos sistemas modais de cria.

No modelo econômico, os *inputs* selecionados foram: "mão de obra" (número de funcionários); "área de pastagem" (hectares); "gastos com aquisição de animais" (R$); "outros custos" (gastos com suplementação, administrativos, manutenção de pastagens, manutenção de benfeitorias e de utilitários, em R$). Os *outputs* do modelo foram: "área de reserva" (hectares) e "receita pecuária bruta" (R$). No modelo socioambiental foram selecionados os *inputs* "área de pastagem" (hectares) e "gastos com aquisição de animais" (R$); como *outputs:* "mão de obra" (quantitativo de pessoal), "área de reserva" (hectares) e "receita pecuária bruta" (R$).

O modelo econômico mede a capacidade de cada sistema de produção gerar receita com preservação da mata nativa, usando como fatores de produção trabalho e capital, e os gastos

correntes. Neste modelo foi imposta a restrição adicional de que o peso da variável "receita pecuária" deve ser maior que o peso da variável "área de reserva". O uso de restrições aos pesos impede que a simples preservação de mata nativa, sem a geração de recursos, torne uma unidade eficiente.

No modelo de desempenho socioambiental o fator de produção "mão de obra" passou a ser um *output*. Neste modelo o interesse é avaliar se o capital (terra) e os custos geram benefícios econômicos (receita), ambientais (preservação de mata nativa) e sociais (geração de empregos). Neste modelo foram igualmente acrescentadas duas restrições aos: peso da variável "mão de obra" deve ser maior que o peso da variável "receita pecuária" e peso da variável "área de reserva" deve ser maior que o peso da variável "receita pecuária". Estas restrições aos pesos impedem que uma DMU alcance a eficiência apenas pelo bom desempenho econômico: ela precisa ter bom desempenho social ou ambiental para ser eficiente neste modelo.

Os sistemas que foram eficientes nos dois enfoques são caracterizados pela escala de produção com maior receita pecuária e também com menor área, porém com receita relativamente alta para a área que é explorada, ou seja, na qual o uso da terra é mais eficiente. Os sistemas que foram mais eficientes no enfoque socioambiental apresentaram maiores receitas em relação às áreas relativas ao tamanho total da reserva. Ao analisar os sistemas de referência observamos que os mesmos possuem valores de receita significativos com áreas grandes de conservação em relação às áreas de pastagens, que são indicadoras de eficiência na gestão, especialmente de pastagens.

Esta abordagem identificou como principais pontos de ineficiência a baixa qualificação da mão de obra e o uso de touros de valor genético questionável. Em sistemas extensivos, com mais razão, estes são pontos importantes de estrangulamento [13]. Tais resultados vêm ao encontro ao descrito por pesquisadores em sistemas de cria no Rio Grande do Sul (RS) que, por meio de técnicas multivariadas para avaliação da variável 'taxa de desmama', concluíram que a intensificação e o aumento da eficiência dos sistemas de cria estão diretamente relacionados à adoção de tecnologias relacionadas à nutrição, reprodução, genética e controle econômico das fazendas [14].

Biotécnicas reprodutivas

As estratégias para a seleção dos touros para os diferentes sistemas de produção da pecuária de corte brasileira, bem como as ferramentas para a tradução dos valores genéticos dos touros selecionados em medidas de lucro estão em pleno desenvolvimento.

Neste processo, a adaptação das biotécnicas reprodutivas aos diferentes biomas do Brasil é um passo fundamental. Pois em paralelo ao uso de animais geneticamente superiores, há necessidade dos rebanhos comerciais maximizarem o ganho em qualidade genética e, realmente, impactarem positivamente os índices zootécnicos. A evolução destas bioténicas reprodutivas, especialmente, a inseminação artificial (IA) e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), é demonstrada pelos dados apresentados na Figura 1.

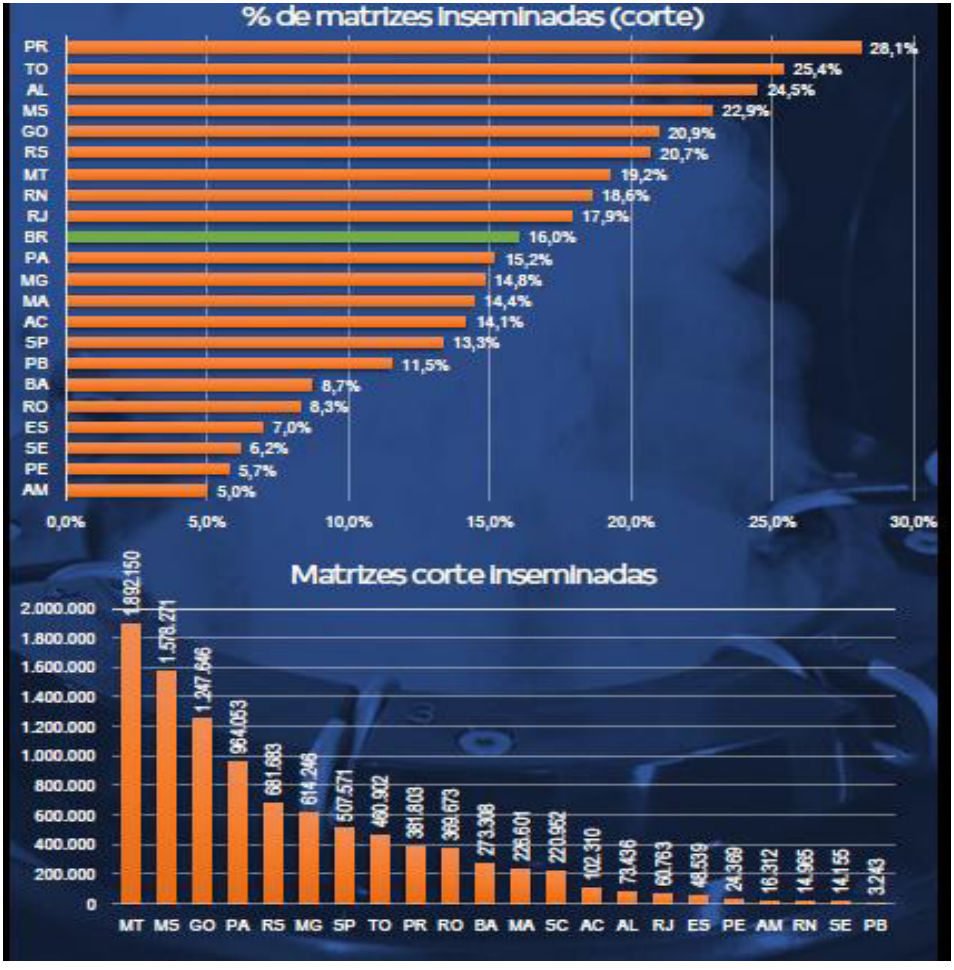


Figura 1 - Uso de Inseminação Artificial por estado - pecuária de corte, 2019.
Fonte: Associação Brasileira de Inseminação artificial; Cepea - Esalq/USP

Trata-se de aspecto importante da utilização de tecnologia direcionada para a melhora dos indicadores econômicos, produtivos e reprodutivos dos rebanhos, pois a adoção da tecnologia de inseminação artificial (IA) e/ou inseminação artificial em tempo fixo (IATF) carreia para o sistema de produção diferentes aspectos de melhorias na gestão, na sanidade e na nutrição dos rebanhos. Como é relatado no projeto +Precoce, liderado pela Embrapa Gado de Corte [15], que a partir do enfoque de sistemas gera informações que vão ao encontro do objetivo de maximizar os diferentes indicadores dos rebanhos de cria no Brasil central.

Na Figura 2 observamos o incremento percentual do uso da biotécnica no rebanho brasileiro nos últimos 8 anos. Apesar do aumento no uso desta tecnologia, há muito espaço para ser difundida, adaptada e aplicada.

Por meio de análise econômica comparando o uso de touros melhoradores em relação a IA [16] foi observado que o ponto crítico determinante desta escolha é o valor genético dos animais, expresso em DEPs, e que os investimentos na aquisição de reprodutores exigem maximizar sua utilização, por meio do aumento da relação touro/vaca para mais de 1:30. E a principal caraterística que mais impacta economicamente o processo é a taxa de prenhez, sendo que um bom desempenho reprodutivo, no entanto, exige eficiência no manejo animal e no gerenciamento da atividade.

Por outro lado, a viabilidade econômica da IATF depende da realização de um repasse da sincronização. A escolha entre esta e a IA tradicional depende das taxas de prenhez obtidas em ambos os processos. A comparação do custo por prenhez em monta natural ou inseminação artificial, com suas variantes, dá uma ideia sobre a eficiência relativa desses processos, mas qualquer tomada de decisão exige uma análise prévia de todo o sistema de produção.

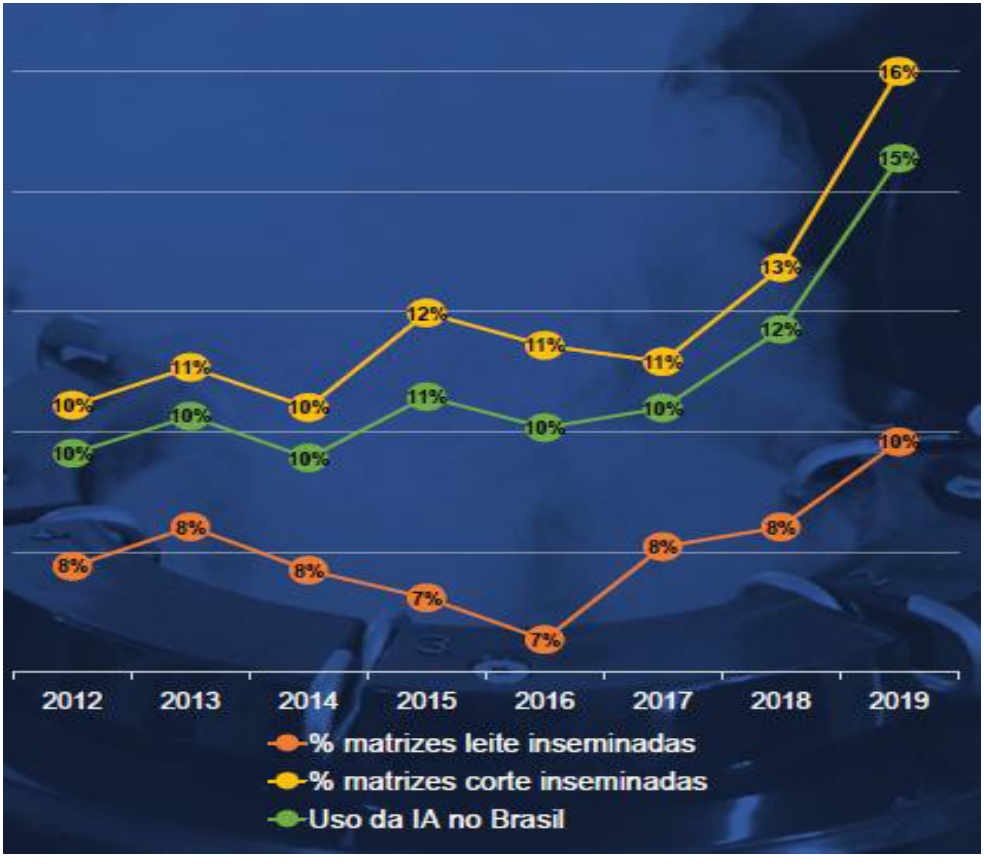


Figura 2 - Percentual de vacas inseminadas no Brasil.

Fonte: Associação Brasileira de Inseminação artificial; Cepea - Esalq/USP

Com a valorização das terras nas Regiões Sul e Sudeste, a bovinocultura extensiva tem perdido campo para outras atividades que proporcionam melhor retorno econômico por unidade de área. Assim, a criação de bovinos tem se expandido para terras mais baratas, embora com boa disponibilidade hídrica. Ou seja, nos últimos anos houve marcante dinâmica nos sistemas pecuários com deslocamento dos rebanhos principalmente para os biomas Cerrado, da Amazônia e da região conhecida por MATOPIBA (confluência dos estados do Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia). Mas especialmente nos últimos anos com a substituição de parte da pecuária por atividades agrícolas no Cerrado observou-se tendência de deslocamento da bovinocultura em direção ao norte do Brasil [17]. Além da tecnificação e especialização dos produtores em determinada fase das etapas da bovinocultura de corte e em sistemas integrados [18].

Assim os protocolos de IA e IATF são constantemente desafiados a serem adaptados aos mais diferentes biomas e sistemas de produção. Avaliações econômicas da implantação da tecnologia ou da combinação entre elas, cada vez direcionam para intensificação dos sistemas com aspectos diferenciados, por exemplo, cada tipo de manejo, raça, clima e as interações entre as variáveis citadas [19] [20] [21] [22] [23]. Inclusive com a utilização de aplicativos que dão suporte a tomada de decisão em relação a qual estratégia utilizar para minimização de custos da aplicação da tecnologia [24]. Além de adaptações práticas direcionadas a maneira como o protocolo é executado com objetivo de melhorar os índices reprodutivos [25] [26].

Um aspecto que deverá ser avaliado com cuidado será o ajuste e a adaptação dos protocolos das biotécnicas reprodutivas para as diferentes regiões do Brasil. Deste modo, especial atenção deve ser dada à interação dos aspectos de fisiologia reprodutiva dos doadores de sêmen com os aspectos nutricionais característicos dos diferentes biomas e das microrregiões onde predominam os rebanhos comerciais de cria. Tudo indica que tal cuidado poderá ser determinante no sucesso da tecnologia, pois possuem efeito direto nos índices de eficiência no desempenho do rebanho de cria que adotam tais tecnologias [27].

Considerações finais

As variáveis reprodutivas interferem diretamente nos fatores econômicos. As escolhas dos produtores em relação à genética a ser utilizada é de fundamental importância para o sucesso de sua atividade pecuária. Por outro lado, o entendimento das inter-relações entre a qualidade genética, a utilização eficiente das biotécnicas reprodutivas e os diversos ambientes, com objetivo de maximizar qualidade e quantidade dos produtos, é a base da sustentabilidade e continuidade da atividade pecuária nos diferentes biomas do Brasil.

Referências bibliográficas

[1] Barcellos, J. O. J.; Oliveira, T. E. de; Marques, P. R.; Canellas, L. C.; Canozzi, M. E. A.; Gomes, A. T. *Bovinocultura de Corte*: Cadeia Produtiva e Sistemas de Produção.1. ed. Porto Alegre: Agrolivros. 2011. 256p.

[2] Baruselli, P. S.; Catussi, B. L. C.; Abreu, L. G. de; Elliff, F. M.; Silva, L. G. da; Batista, E. de O. S. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. *Anim Reprod* 2019;16:364-375. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2019-0050

[3] Marcondes, C. R.; Matos, A. de S. Interação Genótipo-Ambiente em Bovinos: Revisão de Estudos no Brasil. Série Documentos n° 365, Embrapa Amazônia Oriental (CPATU); 2010. 50p.

[4] Hazel, L. N. The Genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics* 1943;28; 476–490.

[5] Bourdon, R. M. Shortcomings of Current Genetic Evaluation Systems. *J. Anim. Sci.* 1998;76:2308–2323.

[6] Mottet, A.; Haan, C. de; Falcucci, A.; Tempio, G.; Opio, C.; Gerber, P. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security* 14 (2017) 1– 8. DOI:10.1016/j.gfs.2017.01.001

[7] Herrero, M.; Thornton, P. K. Livestock and global change: Emerging issues for sustainable food systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110: 20878-20881.

[8] Strassburg, B. B. N. *et al*. When enough should be enough: Improving the use of current agricultural lands could meet production demands and spare natural habitats in Brazil. *Global Environmental Change*. 2014;28: 84–97.

[9] Garnett, T. *et al*. Sustainable Intensification in Agriculture: Premises and Policies. *Science*, 2013;341: 33-34.

[10] Portes, J. V.; Menezes, G. R. O.; MacNeil, M. D.; Silva, L. O. C. da; Gondo, A.; Braccini Neto, J. Selection indices for Nellore production systems in the Brazilian Cerrado. *Livestock Science* 2020; 242: 104309. DOI:10.1016/j.livsci.2020.104309

[11] Abreu, U. G. P.; Rosa, A. N. F.; Portes, J. V.; Nogueira, E.; Silva, J. C. B.; Oliveira, L. O. F. de; Silva, L. O. C. da; Batista, D. S. do N. Touros Nelore Pantaneiros com DEP's: potencial impacto econômico para o sistema de produção. Comunicado Técnico n° 110, Embrapa Pantanal (CPAP); 2019. 9p.

[12] Mello, J. C. C. B. S. de; Gomes, E. G.; Abreu, U. G. P.; Carvalho, T. B. de; Zen, S. de. Análise de desempenho de sistemas de produção modais de pecuária de cria no Brasil. *Produção*, 2013; 23: 877-886. DOI:/10.1590/S0103-65132013005000010

[13] Gomes, E. G.; Abreu, U. G. P.; Mello, J. C. C. B. S. de; Carvalho, T. B. de; Zen, S. de. Economic and socio-environmental performance assessment of beef cattle production systems: a data envelopment analysis (DEA) approach with weight restrictions. *R Bras Zootec*, 2015; 44:219-225. http://dx.doi.org/10.1590/S1806-92902015000600004

[14] Dill, M. D.; Pereira, G. R.; Costa Jr., J. B. G.; Canellas, L. C.; Peripolli, V.; Braccini Neto, J.; Sant'Anna, D. M.; McManus, C.; Barcellos, J. O. J. Technologies that affect the weaning rate in beef cattle production systems. *Trop Anim Health Prod*, 2015; 47:1255–1260. DOI 10.1007/s11250-015- 0856-x

[15] Silva, J. C. B.; Nogueira, E.; Nicacio, A. C.; Abreu, U. G. P.; Oliveira, L. O. F. de; Bergier, I.; Dias, F. R. T.; Juliano, R. S.; Gomes, R. da C.; Menezes, G. R. de O. Projeto Mais Precoce Embrapa: aumentar a produção e qualidade dos bezerros. *Rev Bras Reprod Anim*, 2019; 43: 340-345.

[16] Amaral, T. B.; Costa, F. P.; Corrêa, E. S. Touros Melhoradores ou Inseminacão Artificial: Um Exercício de Avaliação Econômica. Série Documento n° 110, Embrapa Gado de Corte (CNPGC); 2003. 28p.

[17] Almeida, M. M. T. B.; Lixa, A. T.; Oliveira, O. C. de; Fasiaben, M. do C. R. Para onde vai a pecuária bovina brasileira? 2018;56° Reunião da SOBER - Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural.

[18] Santos, M. C. dos. *As transformações da bovinocultura de corte no Brasil e seus impactos no mercado pecuário*. 146 f. Tese (Doutorado em Economia) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2020.

[19] Silva, A. S. da; Silva, E. V. da C. e; Nogueira, N.; Zúccari, E. S. N. Avaliação do custo/benefício da inseminação artificial convencional e em tempo fixo de fêmeas bovinas pluríparas de corte. *Rev Bras Reprod Anim*, 2007;31:443-455.

[20] Gottschall, C. S.; Silva, L. R. da; Almeida, M. R. de. Análise econômica de dois protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em novilhas de corte. *Rev Bras Reprod Anim*, 2016; 40:99-104.

[21] Edwards, S. A. A.; Bo, G. A.; Chandra, K. A.; Atkinson, P. C.; McGowan, M. R. Comparison of the pregnancy rates and costs per calf born after fixed-time artificial insemination or artificial insemination after estrus detection in Bos indicus heifers. *Theriogenology*, 2015;83: 114–120. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.017

[22] Rodrigues, W. B.; Jara, J. do P.; Silva, J. C. B.; Oliveira, L. O. F. de; Abreu, U. G. P.; Anache, N. A.; Silva, K. C. da; Bezerra, A. de O.; Cardoso, C. J. T.; Nogueira, E. Efficiency of mating, artificial insemination or resynchronisation

at different times after first timed artificial insemination in postpartum Nellore cows to produce crossbred calves. *Animal Production Science*, 2019;59:225–231. https://dx.doi.org/10.1071/AN17466

[23] Oliveira, L. Z.; Silva, A. G.; Noronha, I. M.; Oliveira, C. S.; Monteiro, F. M.; Peres, R. F. G.; Graff, H. B.; Rodrigues, A. L. R.; Brandão, F. Z. Influência da dificuldade de inseminação, temperamento e cortisol plasmático sobre a taxa de concepção de vacas e novilhas da raça Nelore inseminadas em tempo fixo. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2019;71:1459-1468. http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162- 10478

[24] Lamb, G. C.; Mercandante, V. R. G. Synchronization and Artificial Insemination Strategies in Beef Cattle. *Vet Clin Food Anim*, 2016;32: 335–347. http://dx.doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.006

[25] Nogueira, E.; Silva, M. R.; Silva, J. C. B.; Abreu, U. P. G.; Anache, N. A.; Silva, K. C.; Cardoso, C. J. T.; Sutovsky, P.; Rodrigues, W. B. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone–estradiol-based protocols. *Animal*. 2019; DOI:10.1017/S1751731119000442

[26] Rodrigues, W. B.; Silva, A. S.; Silva, J. C. B.; Anache, N. A.; Silva, K. C.; Cardoso, C. J. T.; Garcia, W. R.; Sutovsky, P.; Nogueira, E. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal*, 2019;13: 2313 -2318. DOI:10.1017/S1751731119000454

[27] Rodgers, J. C.; Bird, S. L.; Larson, J. E.; Di Lorenzo, N.; Dahlen, C. R.; Di Costanzo, A.; Lamb, G. C. An economic evaluation of estrous synchronization and timed artificial insemination in suckled beef cows. *J. Anim. Sci*. 2012;90:4055–4062. DOI:10.2527/jas2011-4836

Mercado de sêmen em suínos: o papel das centrais de inseminação artificial

Diego Vilela Alkmin
DB Danbred Genética Suína
e-mail: diego@db.agr.br

Abstract: The genetic diffusion via semen doses in swine is a way of genetic update of the multiplier and commercial farms in a fast, safe, economical and practical way. In general, they are semen doses produced by specialized Artificial Insemination (AI) Centers, where the boars at the top of the genetic pyramid are always housed, producing with advanced technology and strict quality and biosecurity controls. AI Centers play an important role in the progress of pig farming, making it possible for any pig producer to always be in line with the progress made by genetic companies, guaranteeing the maximum genetic potential in their animals. In recent years, the Brazilian pig market has followed a trend that was already widespread in the main pig-producing countries in Europe and also in the USA, that is, from the moment that Brazilian producers realized the greatest potential for genetic progress, health advantages and the practicality resulting from the technology, there was this migration to the genetic diffusion via doses of semen of specialized Artificial Insemination (AI) Centers.

Keywords: semen; swine; boar, genetics.

Palavras-chave: sêmen; suíno; varrão, genética.

Introdução

A suinocultura é uma atividade em que a busca por altos índices de produtividade tem estado cada vez mais presente. O principal desafio da indústria suína é otimizar a produção de carne suína e, ao mesmo tempo, garantir sustentabilidade a um custo competitivo. Dessa forma, em sistemas modernos de produção, a lucratividade da operação está sempre correlacionada e altamente dependente da produtividade e eficiência. A produtividade geralmente é avaliada pelo desempenho reprodutivo e, em particular, o desempenho das matrizes. Contudo, muito embora as marrãs e porcas constituem mais de 95% do plantel reprodutivo de uma granja, a responsabilidade no desempenho geral é igualmente compartilhada pelos reprodutores, não podendo-se, portanto, negligenciar a importância do mesmo [1]. Devido a efetiva adoção da técnica de inseminação artificial na indústria suína de forma global nas últimas décadas, paralelamente houve uma intensificação no processo de seleção de reprodutores com o objetivo de atender essas demandas de coberturas [2]. Nesse sentido, a utilização de tecnologias reprodutivas passa a ter grande protagonismo, especialmente as que permitem acelerar o ganho genético, como é o caso da difusão genética via doses de sêmen, promovendo uma atualização contínua do potencial genético do plantel.

Entretanto, essa atualização genética precisa ser realizada de forma rápida, econômica, prática e sanitariamente segura [3]. Assim, a utilização de doses de sêmen via Centrais de Inseminação Artificial (CIA) especializadas, é uma tendência mundial e que já está altamente difundida entre os principais países produtores de carne suína.

No Brasil as CIAs como normalmente são conhecidas, também podem apresentar diferentes denominações dependendo da empresa ou região, como por exemplo, Unidade de Difusão Genética (UDG), Unidade de disseminação de Genes (UDG), Central de Difusão Genética (CDG), Unidade Produtora de Sêmen (UPS), entre outras. Independente da denominação utilizada, essas unidades são consideradas centrais de produção de sêmen especializadas, onde há um objetivo em comum entre todas: produzir doses de sêmen de alta qualidade e potencial fecundante, oriundas de reprodutores do mais alto valor genético.

Entretanto, esse modelo de difusão genética, só se tornou viável e se estabilizou de forma definitiva no mercado devido ao continuo processo de profissionalização que as CIAs têm sido submetidas nos últimos anos, oferecendo doses produzidas com ótima biosseguridade e garantindo os melhores resultados reprodutivos nos programas de inseminação artificial. Nesse contexto, as empresas de genética tiveram um papel fundamental nessa evolução, seja por meio de CIAs próprias ou terceiras, puderam disponibilizar ao produtor, uma forma ágil e eficiente de atualização genética de seu plantel.

Potencial genético

Entre as principais vantagens do modelo de CIA especializadas é promover uma atualização contínua do potencial genético dos planteis atendidos, visando a evolução na eficiência produtiva do rebanho e melhoria nos índices zootécnicos da granja, garantindo, assim, maior retorno econômico para o suinocultor [4].

O plantel de reprodutores nestas unidades é constantemente atualizado, com alta taxa de reposição, superando, geralmente, os 100% ao ano [3]. A cada substituição, o potencial genético médio dos reprodutores é superior à geração anterior, garantindo ao suinocultor a aquisição de doses de sêmen de reprodutores com índices genéticos muito superiores, quando comparados a reprodutores de centrais de inseminação artificial próprias, onde a aquisição dos melhores reprodutores nem sempre é possível e que geralmente não trabalham com taxas de reposição tão altas quanto as CIAs especializadas.

Melhoramento genético

Em um programa de melhoramento genético, o processo de seleção tem como objetivo final criar uma nova geração de animais que seja superior geneticamente à população atual, sendo essa superioridade entendida como uma população de animais com maior produtividade nas características de interesse sob custos reduzidos.

Para máximo desempenho do animal a campo, que representa o resultado final do melhoramento, os objetivos do programa, bem como os critérios de avaliação, devem estar bem alinhados para que o material genético precisamente selecionado seja disseminado até os produtores.

As empresas de melhoramento buscam inovações contínuas para alcançar taxas anuais de ganho genético cada vez mais aprimoradas e com ótima relação custo-benefício. Uma dessas inovações é a predição genômica, na qual oferece o potencial de obtenção de progresso genético de forma mais acelerada, com consequente aumento da produtividade e lucratividade a partir dos descendentes [5].

Os reprodutores presentes em um centro de inseminação artificial são selecionados por seu potencial genético superior, com o "superior" sendo definido como por possuir características que o produtor deseja que seja transmitido ao seu plantel [6]. Somado a isso, uma central especializada revisa constantemente os índices genéticos dos reprodutores, decidindo pelo descarte, caso não cumpra os requisitos mínimos necessários.

Pressão de seleção

A atualização genética do plantel de uma granja com a utilização de sêmen via CIA especializada, advém da utilização de reprodutores de alto potencial genético, classificados geneticamente sob rigoroso programa de seleção.

No processo de avaliação e seleção dos reprodutores em uma empresa de melhoramento genético, a intensidade de seleção realizada pelo programa de melhoramento é bastante significativa, chegando a 1%. Isto quer dizer, por exemplo, que em uma população de 100 reprodutores avaliados, apenas um macho é selecionado para repor o plantel da própria central, o que permite identificar com grande acurácia o animal de maior potencial genético.

Com isso, ao receber uma dose de sêmen de uma central de IA, o suinocultor estará transferindo direto para sua granja, um material genético de altíssima qualidade, o que não seria possível a partir da opção da aquisição de um macho para produção das doses em central própria, onde não seria possível aplicar a mesma pressão de seleção na escolha dos reprodutores.

Evolução no sistema de reprodução

A transição ocorrida na indústria suína, saindo do modelo de monta natural para a IA foi relatada em países europeus na década de 1960, de forma que em meados da década de 1980, alguns países europeus já possuíam entre 50% a 75% de seus rebanhos comerciais usando a IA (revisado por [7]). Dessa forma, os centros de inseminação artificial se estabeleceram na década de 1980, onde um número significativo de reprodutores fora alojado visando a produção de sêmen [8]. De acordo com [9], no ano 2000 pode se observar um aumento significativo no uso de IA em todo o mundo, de forma que em vários países, praticamente a totalidade dos suínos já eram produzidos via IA.

Outra mudança significativa na indústria suína se deu pela decisão de separar as operações de produção de sêmen das granjas de reprodução, sendo importante para permitir que os centros de IA se especializassem na produção de sêmen e que as granjas pudessem se concentrar em manejos reprodutivos com maior eficiência na produção [7].

No Brasil, a preferência pela aquisição de doses de CIAs especializadas têm ocorrido de forma linear nos últimos anos. Na busca por maior eficiência na produção, os produtores têm cada vez mais reconhecido as vantagens da utilização de doses produzidas em tais modelos de centrais, tanto pela maior qualidade da dose, quanto pelo material genético nela contida. O uso de alta tecnologia permite maior padronização dos procedimentos de trabalho, reduzindo os riscos de falhas e garantindo maior confiabilidade quanto à qualidade das doses produzidas. Adicionalmente, o fato de ali estarem alojados sempre os reprodutores do topo da pirâmide genética, empregando altas taxas de reposição, garantem o fornecimento de material genético superior, de forma que estes fatores figuram-se como principais vantagens quando este sistema é comparado à produção das doses dentro da própria granja.

Atualmente, os principais sistemas de produção dependem fortemente da entrada de leitoas de reposição e doses de sêmen em cada um dos diferentes níveis de produção. No entanto, mais recentemente, é possível observar uma forte tendência visando reduzir o risco de entrada de doenças na granja, na qual envolve o fechamento do rebanho para a entrada de novos animais, de forma que a introdução de novos genes seria feita exclusivamente através do uso de sêmen [7]. Nesse cenário, as CIAs especializadas passam a ter um papel ainda mais importante na manutenção da evolução genética do plantel.

Controle e segurança sanitária

A saúde geral dos animais presentes nas granjas foi beneficiada pela separação dos CIAs para um local externo, de forma que muitas unidades foram capazes de atingir o status de livre de patógenos específicos, onde operam as unidades de produção no mais alto status sanitário. Isso é explicado pela expressiva redução de novas entradas de reprodutores na unidade em decorrência da necessidade de alta taxa de reposição dos machos em uma central, mantendo, assim, maior estabilidade sanitária do plantel.

Adicionalmente, as CIAs possuem uma grande responsabilidade quanto à segurança sanitária das granjas que irão receber o sêmen. Considerando ser possível produzir várias doses inseminantes a partir de um único ejaculado, as quais poderão ser distribuídas para diferentes granjas, no caso da presença de patógenos no sêmen, haveria um aumento no risco de rápida disseminação desses patógenos (revisado por [10]). Contudo, de forma oposta, as CIAs especializadas se tornaram um importante aliado na prevenção da disseminação de patógenos na suinocultura em virtude da adoção de protocolos de biossegurança extremamente rígidos e assegurando que os machos alojados nas unidades estejam livres de doenças, através de um monitoramento da saúde realizado de forma periódica.

De acordo com Instrução Normativa do Ministério da Agricultura (MAPA), todas as granjas que comercializam ou distribuem reprodutores de suídeos, bem como centrais de inseminação artificial, devem possuir o certificado de Granja de Reprodutores Suídeos Certificada – GRSC. Dessa forma, as centrais de IA são controladas sanitariamente pelas autoridades, de acordo com a legislação, duas vezes por ano.

Adicionalmente, todas as unidades que comercializam sêmen devem estar certificadas pelo MAPA como Central de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), onde veterinários oficiais realizam auditorias, sendo avaliados todos os procedimentos relativos à coleta higiênica do sêmen e produção das doses de sêmen.

Tais procedimentos, somados ao compromisso e preocupação da própria CIA quanto à segurança da dose produzida a ser entregue aos produtores, são garantias de que os riscos sanitários são minimizados ao adquirir doses de sêmen de CIAs especializadas.

Considerações finais

A suinocultura atual é uma atividade que busca por altos índices de produtividade, e por isso, o suinocultor está constantemente em busca de animais com elevado potencial genético.

As CIAs especializadas evoluíram de forma surpreendente nos últimos anos e não há a menor dúvida de que continuarão a evoluir, valorizando sua importância para a indústria suína no Brasil e no mundo. A difusão genética via doses de sêmen torna possível que qualquer produtor esteja sempre em linha com o progresso obtido pelas empresas de melhoramento genético, garantindo o máximo potencial genético em seus animais.

A tendência global no uso de doses de sêmen via CIAs especializadas é uma resposta do mercado, que está sempre em busca de novas tecnologias que possam contribuir para a evolução do sistema de produção de suínos. Não há dúvidas que esse é um caminho sem volta, a tendência é que cada vez mais os produtores irão adotar essa tecnologia e usufruir das inúmeras vantagens.

Referências bibliográficas

[1] Kuster, C. E.; Althouse, G. C. Reproductive Physiology and Endocrinology of Boars. In: Current Therapy in Large Animal Theriogenology. WB Saunders, 2007; 717-721.

[2] Althouse, G. C. 15 Applied Andrology in Swine. Animal andrology: theories and applications, 2014, 404.

[3] Alkmin, D. V. "Central de IA em suínos: Uma análise prática do processo de produção de sêmen de alta qualidade." *Rev. Bras. Reprod. Anim* 2019; 43.2, 327-330.

[4] Culbertson, M. S.; Herring, W. O.; Holl, J. W.; Casey, D. Genetic improvement and dissemination for the global commercial swine industry. *Animal Production Science*, 2017; 57, 2366-2369.

[5] Garrick, D. J. The role of genomics in pig improvement. *Animal Production Science* 2017; 57.12, 2360-2365.

[6] Robinson, J. A. B.; Buhr, M. M. Impact of genetic selection on management of boar replacement. *Theriogenology* 2005; 63.2, 668-678.

[7] Knox, R. V. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 2016; 85.1, 83-93.

[8] Reed, H. C. B. Artificial insemination. In: Cole, D. J. A.; Foxcroft, G. R. (ed.). *Control of pig reproduction*. London: Butterworth Scientific; 1982. p. 65–90.

[9] Weitze, K. F. Update on the worldwide application of swine AI. In: Johnson, L. A.; Guthrie, H. D. (ed.). IVth International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, MD. Allen Press Inc, Lawrence KS; 2000. p. 141–6.

[10] Maes, D.; Van Soom, A.; Appeltant, R.; Arsenakis, I.; Nauwynck, H. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology* 2016; 85, 27-38.

O papel dos componentes do plasma seminal para elevar a fertilidade de espécies domésticas

Seminal plasma components to improve fertility of the domestic species

Fabiana Ferreira de Souza[1]
fabiana.f.souza@unesp.br
Caroline Scott[1]
André Maciel Crespilho[2]

Abstract: Seminal plasma is formed by secretions from several compartments of reproductive system of males, including testes, epididymis, deferent ducts, sexual accessory glands, and urethra. Each compartment has a function and provides macromolecules for sperm to perform their functions. Proteins are the main macromolecules, since they are the most abundant in cells and body fluids, such as seminal plasma. The main functions performed by proteins are related with protection against early capacitation (decapacitation factors), capacitation (in the female reproductive tract), acrosome reaction, binding to the uterine tube (sperm reservoir), binding between gametes, and fertilization. Proteins can be free (in solution, secreted proteins) or contained in extracellular vesicles (exosomes and microvesicles). The BSPs and osteopontin were main proteins found in bovines and other species. Our group have studied the seminal proteins from several species, including buffaloes, bovines, equines, canines, felines, and birds, and identified differences between the animals. In canines, felines and birds the studies are still superficial and need to be deepened in order to establish some connection between seminal plasma proteins and fertility, to contribute for reproduction or contraception.

Keywords: protein; spermatozoa; capacitation.

Palavras-chave: *proteína*; espermatozoide; capacitação.

Introdução

Nas diferentes espécies, a busca de marcadores de fertilidade tem sido o propósito de vários estudos, com objetivos diversos. Nos animais de produção, como bovinos, ovinos, caprinos e suínos, nos quais existe influência da seleção de reprodutores, os marcadores de fertilidade são apropriados para identificação de machos de alto valor genético, adicionando uma característica a mais á seleção. Nos equinos, o mesmo propósito existe, contudo nesta espécie, a seleção de reprodutores é fenotípica e busca-se marcadores que possam contribuir com o aumento da fertilidade, mesmo que acrescidos ao sêmen de animais de menor fertilidade. Já nos animais de companhia e silvestres, marcadores de fertilidade tem dois propósi-

[1] Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

[2] Medicina Veterinária, UNISA, São Paulo, SP, Brasil.

tos, a identificação de reprodutores de maior fertilidade, assim como a busca por elementos que possam contribuir para a reprodução ou o seu controle, a contracepção.

Nas espécies de produção, a seleção dos melhores reprodutores é necessária, uma vez que o cálculo dos custos de produção de um animal é baseado nos custos de criação como alimentação, sanidade, entre outros. Por outro lado, o controle da superpopulação de animais errantes, seja cães e gatos, assim como animais silvestres (exemplo, capivaras) contribui para a minimização de problemas de saúde pública.

Nestas propostas, as macromoléculas contidas no plasma seminal já foram estudadas. Dentre estas moléculas, as proteínas foram descritas em maior frequência, já que são os principais elementos que compõe as células e são secretadas nos líquidos corporais. Quando secretadas nos líquidos corporais, podem estar livres (em solução) ou contidas em vesículas extracelulares (exossomos e microvesículas) [1,2].

A composição proteica do plasma seminal, tem sido estudada desde a década de 50 e, desde então, várias proteínas foram implicadas na fertilidade [3-8], congelabilidade do sêmen [9-11] entre outras características espermáticas. Estas proteínas foram sugeridas como marcadoras de fertilidade.

Marcadores de fertilidade nos machos são mais eficazes do que a seleção das fêmeas, já que os machos são capazes de gerar maior número de descendentes do que as fêmeas [12]. Na espécie bovina, aproximadamente 20 a 40% de uma população de touros não selecionados possuem fertilidade reduzida, prolongando o intervalo entre partos e diminuindo o número de nascimentos. Desta forma, programas de reprodução, que incluem a inseminação artificial, e/ou em rebanhos com poucos animais, a utilização de machos com alta fertilidade é ainda mais necessário [13]. Em vista disso, o objetivo deste texto é descrever componentes do plasma seminal que contribuem para fertilidade ou que possam ser utilizados como contraceptivos.

Percepções sobre as proteínas do plasma seminal

Na última década, pesquisas utilizando distintas metodologias tentaram comprovar que o plasma seminal, especialmente em bovinos, contém proteínas associadas com a fertilidade [14-20]. De fato, o plasma seminal é uma mistura das secreções dos testículos, epidídimos, glândulas sexuais acessórias e uretra, que modulam funções cruciais na reprodução como motilidade espermática, capacitação, proteção celular, reação do acrossomo, fertilização e desenvolvimento embrionário. A despeito do plasma seminal não ser fator determinante para o sucesso reprodutivo [21], várias proteínas presentes neste fluido, estão relacionadas com a fertilidade [22,23].

O interesse em estudar o envolvimento das proteínas do plasma seminal na fertilidade não é recente. Killian *et al.* [24] estudaram as proteínas do plasma seminal bovino por eletroforese bidimensional e sugeriram 4 proteínas relacionadas com a fertilidade de touros. A partir da densidade óptica dos *spots*, desenvolveram um modelo de regressão para predizer a fertilidade. Posteriormente, uma das proteínas (55 kDa) encontrada em touros de maior fertilidade foi identificada como *osteopontin* [25].

Estudos também da década de 90 determinaram as *bovine seminal proteins* (BSPs), inicialmente encontradas no plasma seminal de bovinos e, atualmente denominadas *binder of sperm* (BSPs) *proteins*, por estarem presentes em outras espécies. As BSPs são importantes moléculas que possuem capacidade de ligação à heparina e contribuem para capacitação e reação do acrossomo. Durante a ejaculação, se ligam aos fosfolipídeos colina da membrana espermática [26] e atuam, inicialmente, como fatores decapacitantes [27]. Quando os espermatozoides se encontram no trato reprodutor feminino, as BSPs se ligam à proteínas similares a heparina, especialmente as glicosaminoglicanas e também as *high-density lipoproteins* (HDLs), o que modifica a membrana do espermatozoide, sequestrando o colesterol inserido na membrana e iniciando a cascata da capacitação espermática e reação do acrossomo [14,28]. Podem se ligar a outros componentes como colágeno, fibrinogênio e apolipoproteina A1 [29-32]. A capacidade de ligação é conferida pela presença dos domínios tipo fibronectina II [33]. Além disso, estas proteínas são responsáveis pela ligação dos espermatozoides á tuba uterina, mantendo um reservatório no trato reprodutor da fêmea e a maior longevidade das células espermáticas [34]. As BSPs são divididas em 3 tipos BSP1 (antes conhecida como PDC-109 ou BSP-A1/-A2), com 15 a 16,5 kDa, BSP3 (antes conhecida como BSP-A3) com 15 a 16,5 kDa e BSP5 (antes conhecido como BSP-30kDa), de 20 a 30 kDa [20,33]. Em bovinos, compõe 40 a 57% das proteínas do plasma seminal [26,35,36], sendo a BSP 1, de 25 a 47%, a mais abundante, seguida pela BSP3 com 0,4 a 0,9%. A BSP5 está em menor concentração com 0,5 a 1% da fração proteica total das BSP [37]. Outras espécies possuem proteínas homólogas as BSPs, como ovinos [38], caprinos [39], suínos [40,41], equinos [40,42,43] e, possivelmente, os cães (Souza, comunicação pessoal).

As BSPs podem contribuir ou não para a maior fertilidade, já que podem induzir a capacitação precoce. Este conceito foi relacionado com a maior abundância da BSP1 em touros com menor fertilidade [44]. Também há uma relação entre a indução da capacitação prematura pelas BSPs após a congelação do sêmen, já que as BSPs estão em contato de maneira tempo-dependente com os espermatozoides e isto pode induzir a perda de lipídeos da membrana e tornar as células sensíveis a congelação e ao choque térmico [45,46]. Esta teoria foi levantada em alguns estudos, os quais também incluem o mecanismo de proteção da gema do ovo e do leite como componentes do diluente de sêmen em diferentes espécies. Após a colheita e diluição do ejaculado com diluentes contendo leite, as BSPs de bovinos são sequestradas pelas caseínas contidas no leite de forma tempo-dependente, mantendo a motilidade e viabilidade espermática e reduzindo a perda de lipídeos e colesterol da membrana durante o armazenamento [47]. A afinidade é maior para a BSP1 quando comparada com a BSP3 e BSP5 nos bovinos [48]. Em ovinos, suínos e equinos são sequestradas pelas *α-lactalbumin*, *β-lactoglobulin*, *κ-casein* e micelas de *casein* impedindo sua ligação à membrana espermática e, consequentemente, evitando a mobilização do colesterol e instabilidade da membrana [49]. Com relação a gema do ovo, o mecanismo de ação é similar as proteínas do leite e amostras congeladas com gema de ovo ou com uma fração da gema contendo LDLs preveniram entre 50 a 80% a ligação das BSPs à membrana [37,45], protegendo as células contra a perda de colesterol e fosfolipídeos.

Com o advento da espectrometria de massas, tornou-se possível identificar as proteínas diferentemente expressas entre animais com alta e baixa fertilidade. Além da *osteopontin* e as BSPs, a *phospholipase A2*, *P25b*, *acidic seminal fluid*, *a-L-fucosidase* e *cathepsin D* também foram correlacionadas com a fertilidade bovina e são sugeridas como marcadoras [22].

Estudo conduzido em nosso laboratório com sêmen bovino encontrou as BSPs e osteopontin no plasma seminal e nos espermatozoides ejaculados, mas foi ausente nos espermatozoides e fluído do epidídimo [50]. Também verificamos que a osteopontin aumenta a fertilidade *in vitro* de células espermáticas sexadas e não-sexadas e a ligação dessas células à tuba uterina na mesma espécie [51]. Interessantemente, em outro estudo do nosso grupo, a ostopontina ou as BSPs não foram encontradas em maior abundância em búfalos com características espermáticas superiores, espécie correlata aos bovinos [52]. Em uma comparação entre as duas espécies, nós encontramos 4 proteínas em maior abundância nos búfalos (*cystatin C*, *prosaposin*, *peptide YY* e *keratin type II cytoskeletal 5*) e 9 nos bovinos (*spermadhesin-1*, *seminal plasma protein PDC-109*, *ribonuclease 4*, *metalloproteinase inhibitor 2*, *acrosin inhibitor 1*, *seminal ribonuclease*, *C-type natriuretic peptide*, *angiogenin-1* e *osteopontin*) [53].

Em equinos, as principais proteínas que compõe o plasma seminal são as HSPs, especialmente a HSP1 [54] as quais são similares as BSPs em bovinos e apresentam funções na capacitação espermática [55]. A HSP1 perfaz 70% das proteínas do plasma seminal e também possui domínios tipo fibronectina II [54]. Em nosso laboratório, outras proteínas foram encontradas em maior abundância no plasma seminal equino, a CRISP3 e KLK1E2 [56].

As proteínas do plasma seminal de cães foram, inicialmente, descritas por Souza *et al.* [57], utilizando técnicas já ultrapassadas. Neste estudo, apenas as massas moleculares forma mencionadas e as proteínas encontradas foram relacionadas com as características espermáticas, como motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática. Anteriormente, nosso grupo havia descrito as proteínas ligadoras de heparina, utilizando técnica similar e cromatografia líquida de afinidade [58]. Porém da mesma maneira que o estudo anterior, a identificação das proteínas não foi efetuada. Em 2009, tentamos identificar a osteopontina no plasma seminal de cães por *western blotting* [59]. Algumas proteínas foram marcadas, mas posteriormente não fomos capazes de identificar a osteopontina por espectrometria de massas [60-62]. Apesar disso, Camargo [63] identificou no tecido testicular e diferentes porções do epidídimo a osteopontina por imunohistoquímica. Nosso grupo também demonstrou influência da (Golden Retriever, Great Dane, Bernese Mountain Dog, Belgian Malinois e Maremmano- Abruzzese Sheepdog) em relação a composição proteica do plasma seminal [61]. Outros grupos têm trabalhado com a identificação de proteínas do plasma seminal de cães, como Aquino-Cortez *et al.* [64], que descreveram a 268 proteínas nas 2º e 3º frações do ejaculado canino, e as proteínas *arginine esterase* e *lactotransferrin precursor* foram as principais encontradas.

Em gatos, ainda há escassos estudos a respeito das proteínas do plasma seminal. As principais proteínas encontradas nesta espécie foram *glutathione peroxidases (GPx5 and 6)*, *prostatic acid phosphatase (ACPP)*, *β-hexosaminidase (HEXB)*, *polymeric immunoglobulin receptor (pIgR)* e *serpin family F member 1 (SERPINF1)* [65]. Nosso grupo também identificou

proteínas do plasma seminal de gatos e encontramos como principais a *cysteine rich secretory protein 3* e *epididymal sperm binding protein* [66].

Em perdizes (*Rhynchotus rufescens*) nosso grupo identificou proteínas em maior abundância no plasma seminal, sendo estas várias isoformas de *keratin*, *tubulin beta chain (Fragment)* e *glutathione S-transferase Mu 5*. Neste estudo, apenas a descrição das proteínas foi realizada [67].

Considerações finais

O plasma seminal é um conjunto de elementos que interagem de forma orquestrada a fim de promover os eventos reprodutivos. Várias outras proteínas do plasma seminal são descritas na literatura em diferentes espécies. Estas proteínas foram correlacionadas com a fertilidade e estão envolvidas em diferentes processos relacionados com as funções espermáticas. Estas moléculas podem identificar animais com maior fertilidade (biomarcadores), assim como antígenos contraceptivos.

Referências bibliográficas

[1] Du, J.; Shen, J.; Wang, Y.; Pan, C.; Pang, W.; Diao, H.; Dong, W. Boar seminal plasma exosomes maintain sperm function by infiltrating into the sperm membrane. *Oncotarget* 2016;7(37):58832- 58847.

[2] Rowlison, T.; Cleland, T. P.; Ottinger, M. A.; Comizzoli, P. Novel proteomic profiling of epididymal extracellular vesicles in the domestic cat reveals proteins related to sequential sperm maturation with differences observed between normospermic and teratospermic individuals. MCP 2020;19:2090-2104.

[3] Rahman, M. S.; Lee, J. S.; Kwon, W. S.; Pang, M. G. Sperm proteomics: road to male fertility and contraception. *Intern J Endocrin* 2013;1-11.

[4] Kwon, W. S.; Oh, S. A.; Kim, Y. J.; Rahman, M. S.; Park, Y. J.; Pang, M. G. Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Sci Reports* 2015;1-10.

[5] Selvam, M. K.; Agarwal, A. Update on the proteomics of male infertility: a systematic review. *Arab J Urol* 2018;16:103–112.

[6] D'Amours, O.; Frenette, G.; Bourassa, S.; Calvo, E.; Blondin, P.; Sullivan, R. Proteomic markers of functional sperm population in bovines: comparison of low- and high-density spermatozoa following cryopreservation. *J Proteome Res* 2018;17(1):177–188.

[7] Viana, A. G. A.; Martins, A. M. A.; Pontes, A. H.; Fontes, W.; Castro, M. S.; Ricart, C. A. O.; Sousa, M. V.; Kaya, A.; Topper, E.; Memili, E.; Moura, A. A. Proteomic landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Sci. Rep*. 2018;8(1):16323.

[8] Selvam, M. K. P.; Agarwal, A. Sperm and seminal plasma proteomics: molecular changes associated with varicocele-mediated male infertility. *World J Mens Health* 2020 Oct;38(4):472- 483.

[9] Westfalewicz, B.; Dietrich, M. A.; Ciereszko, A. Impact of cryopreservation on bul semen proteome. *J Anim Sci* 2015;93(11):5240-5253.

[10] D'Amours, O.; Calvo, E.; Bourassa, S.; Vincent, P.; Blondin, P.; Sullivan, R. Proteomic markers of low and high fertility bovine spermatozoa separated by Percoll gradient. *Mol Reprod Develop* 2019;86(8):999-1012.

[11] Pérez-Patiño, C.; Li, J.; Barranco, I.; Martínez, E. A.; Rodriguez-Martínez, H.; Roca, J.; Parrilla, I. The proteome of frozen-thawed pig spermatozoa is dependent on the ejaculate fraction source. *Sci Reports* 2019;9:1-13.

[12] McDanield, T.; Kuehn, L. Male chromosome hinders female cattle reproduction. *Agricultural Res* 2014;62:12-13.

[13] Kastelic, J. P.; Thundathil, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim* 2008;43:368-373.

[14] Lafleur, M.; Courtemanche, L.; Karlsson, G.; Edwards, K.; Schwartz, J. L.; Manjunath, P. Bovine binder-of-sperm protein BSP1 promotes protrusion and nanotube formation from liposomes. *Bioch Biophys Res Communic* 2010;399(3):406-411.

[15] Druart, X.; Rickard, J. P.; Mactier, S.; Kohnke, P. L.; Kershaw-Young, C. M.; Bathgate, R.; Gibb, Z.; Crossett, B.; Tsikis, G.; Labas, V.; Harichaux, G.; Grupen, C. G.; De Graaf, S. P. Proteomic characterization, and cross species comparison of mammalian seminal plasma. *J Proteomics* 2013;91:13-22.

[16] Folhadella, I. M.; Castro, T. S.; Salvador, D. F.; Sá, W. F.; Ferreira, A. M.; Ramos, A. A.; Polisseni, J.; Serapião, R. V.; Camargo, L. A.; Andrade, V. J.; Santoro, M. M.; Oliveira, J. S.; Rodrigues, L. H.; Vale Filho, V. R. Identificação de proteínas do plasma seminal de touros da raça Gir. *Rev Brasil Reprod Anim* 2013;37(1):64-71.

[17] Aslam, M. M.; Kumaresan, A.; Sharma, V. K.; Tajmu, M.; Chhillar, S.; Chakravarty, A. K.; Yadav, S. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology* 2014;82(9):1254-1262.

[18] Rego, J. P. A.; Crisp, J. M.; Moura, A. A.; Nouwens, A. S.; Li, Y.; Venus, B.; Mcgowan, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated Bos indicus bulls. *Anim Reprod Sci* 2014;148(1):1-17.

[19] Boe-Hansen, G. B.; Rego, J. P. A.; Crisp, J. M.; Moura, A. A.; Nouwens, A. S.; Li, Y.; Mcgowan, M. R. Seminal plasma proteins and their relationship with percentage of morphologically normal sperm in 2-year- old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim Reprod Sci* 2015;162:20-30.

[20] Rodríguez-Villamil, P.; Hoyos-Marulanda, V.; Martins, J. A. M.; Oliveira, A. N.; Aguiar, L. H.; Moreno, F. B.; Bertolini, M. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine *in vitro* embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. *Theriogenology* 2016;85(3):540-554.

[21] Monteiro, G. A.; Papa, F. O.; Guasti, P. N.; Freitas, N. P. P.; Melo-Oña, C. M.; Avanzi, B. R. Fertility of epididymal cauda sperm from subfertile stallions. *Vet Zootec* 2011;18:255-263.

[22] Kumar, P.; Kumar, D.; Singh, I.; Yadav, P. S. Seminal plasma proteome: promising biomarkers for bull fertility. *Agricultural Res* 2012;1:78–86.

[23] Moura, A. A.; Memili, E. Functional aspects of seminal plasma and sperm proteins and their potential as molecular markers of fertility. *Anim Reprod* 2016;13(3):191-199.

[24] Killian, G. J.; Chapman, D. A.; Rogowski, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 1993;49:1202-1207.

[25] Cancel, A. M.; Chapman, D. A.; Killian, G. J. Osteopontin localization in the Holstein bull reproductive tract. *Biol Reprod* 1999;60(2):454-460.

[26] Manjunath, P.; Thérien, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002;53(1):109- 119.

[27] Manjunath, P.; Soubeyrand, S.; Chandonnet, L.; Roberts, K. D. Major proteins of bovine seminal plasma inhibit phospholipase A2. *Biochem J* 1994;303(1):121-128.

[28] Therien, A.; Manjunath, P.; Lafleur, M. Chemical and physical requirements for lipid extraction by bovine binder of sperm BSP1. *Bioch Bioph Acta* (BBA)-Biomembranes 2013;1828(2):543-551.

[29] Manjunath, P.; Sairam, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma. *Biochem J* 1987;241(3):685-692.

[30] Manjunath, P.; Marcel, Y. L.; Uma, J.; Seidah, N. G.; Chretien, M.; Chapdelaine, A. Apolipoprotein AI binds to a family of bovine seminal plasma proteins. *J Biol Chem* 1989;264(28):16853-16857.

[31] Chandonnet, L.; Roberts, K. D.; Chapdelaine, A.; Manjunath, P. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Devel* 1990;26(4):313-318.

[32] Gasset, M.; Saiz, J. L.; Laynez, J.; Sanz, L.; Gentzel, M.; Töpfer-Petersen, E.; Calvete, J. J. Conformational features and thermal stability of bovine seminal plasma protein PDC-109 oligomers and phosphorylcholine-bound complexes. *European J Biochem* 1997;250 (3):735-744.

[33] Manjunath, P.; Lefebvre, J.; Jois, P. S.; Fan, J.; Wright, M. W. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod* 2009;80(3):394-397.

[34] Gwathmey, T. M.; Ignotz, G. G.; Mueller, J. L.; Manjunath, P.; Suarez, S. S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol Reprod* 2006;75(4):501–507.

[35] Greube, A.; Muller, K.; Topfer-Petersen, E.; Herrmann, A.; Muller, P. Influence of the bovine seminal plasma protein PDC-109 on the physical state of membranes. *Biochemistry* 2001;40:8326–8334.

[36] Manjunath, P.; Bergeron, A.; Lefebvre, J.; Fan, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *Reprod Dom Anim* 2007;65:217- 228.

[37] Nauc, V.; Manjunath, P. Radioimmunoassays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30-Kilodaltons), and their quantificationin seminal plasma and sperm. *Biol Reprod* 2000;63(4):1058-1066.

[38] Bergeron, A.; Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 2005;71(4):461–470.

[39] Villemure, M.; Lazure, C.; Manjunath, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1(1):39.

[40] Calvete, J. J.; Raida, M.; Gentzel, M.; Urbanke, C.; Sanz, L.; Topfer-Petersen, E. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. FEBS Lett 1997;407(2):201–206.

[41] Lusignan, M. F.; Bergeron, A.; Crete, M. H.; Lazure, C.; Manjunath, P. Induction of epididymal boar sperm capacitation by pB1 and BSP-A1/-A2 proteins, members of the BSP protein family. *Biol Reprod* 2007;76(3):424–32.

[42] Calvete, J. J.; Mann, K.; Schafer, W.; Sanz, L.; Reinert, M.; Nessau, S. *et al*. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995;310:615–622.

[43] Menard, M.; Nauc, V.; Lazure, C.; Vaillancourt, D.; Manjunath, P. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid-binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Mol Reprod Dev* 2003;66(4):349–357.

[44] Somashekar, L.; Selvaraju, S.; Parthipan, S.; Ravindra, J. P. Profiling of sperm proteins and association of sperm PDC-109 with bull fertility. *Syst Biol Reprod Med* 2015;61:376–387.

[45] Bergeron, A.; Crête, M. H.; Brindle, Y.; Manjunath, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 2004;70:708–717.

[46] Bergeron, A.; Manjunath, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1338–1344.

[47] Bergeron, A.; Brindle, Y.; Blondin, P.; Manjunath, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol Reprod* 2007;77:120–126.

[48] Lusignan, M.; Bergeron, A.; Lafleur, M.; Manjunath, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. *Biol Reprod* 2011;85:457–464.

[49] Plante, G.; Lusignan, M.; Lafleur, M.; Manjunath, P. Interaction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reprod Biol Endocrin* 2015;92:1-13.

[50] Cárdenas, D. S. S. Estudo das proteínas do plasma seminal, fluído epididimário e dos espermatozoides colhidos do ejaculado e do epidídimo de touros. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2017.

[51] Vallejo-Aristizábal, V. Efeitos da osteopontina (OPN) ao sêmen sexado bovino. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2018.

[52] Codognoto, V. M.; Yamada, P. H.; Schmith, R. A.; Ruediger, F. R.; Scott, C.; Lainetti, P. F.; Brochine, S.; Freitas-Dell'Aqua, C. P.; Souza, F. F.; Oba, E. Functional insights into the role of seminal plasma proteins on sperm motility of buffalo. *Anim Reprod Sci* 2018;195:251–258.

[53] Codognoto, V. M.; Yamada, P. H.; Schmith, R. A.; Ruediger, F. R.; Freitas-Dell'Aqua, C. P.; Souza, F. F.; Brochine, S.; Carmo, L. M.; Vieira, A. F.; Oba, E. Cross comparison of seminal plasma proteins from cattle and buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reprod Domest Anim* 2020;55(1):81-92.

[54] Ekhlasi-Hundrieser, M.; Scheafer, B.; Kirchhoff, C.; Hess, O.; Bellair, S.; Müller, P.; Töpfer-Petersen, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 2005;70:45-57.

[55] Töpfer-Petersen, E.; Ekhlasi-Hundrieser, M.; Kirchhoff, C.; Leeb, T.; Sieme, H. The role of stallion seminal plasma proteins infertilisation. *Anim Reprod Sci* 2005;89:159–170.

[56] Guasti, P. N.; Souza, F. F.; Scott, C.; Papa, P. M.; Camargo, L. S.; Schmith, R. A.; Monteiro, G. A.; Hartwig, F. P.; Papa, F. O. Equine seminal plasma and sperm membrane: functional proteomic assessment. *Theriogenology* 2020;156:70-81.

[57] Souza, F. F.; Barreto, C. S.; Lopes, M. D. Characteristics of seminal plasma proteins and their correlation with canine semen analysis. *Theriogenology* 2007;68(1):100–106.

[58] Souza, F. F.; Martins, M. I.; Fernandes, S. C. E.; Ribolla, P. E.; Lopes, M. D. Heparin-binding proteins of canine seminal plasma. *Theriogenology* 2006;66:1606-1609.

[59] Souza, F. F.; Chirinéa, V. H.; Martins, M. I.; Lopes, M. D. Osteopontin in seminal plasma and sperm membrane of dogs. *Reprod Domest Anim* 2009;44(Suppl 2):283-286.

[60] Camargo, L. S. Correlação das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de cães. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2017.

[61] Araújo, M. S. Avaliação do sêmen refrigerado com ou sem plasma seminal e sua correlação com as proteínas do ejaculado de diferentes raças caninas. 2018. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2018.

[62] Paulo, O. L. O. H. Perfil proteico do sêmen de cães: em busca de um antígeno espermático para contracepção. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2019.

[63] Camargo, L. S. Imunolocalização da osteopontina e assinaturas proteômicas do trato reprodutor de cães. 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2020.

[64] Aquino-Cortez, A.; Pinheiro, B. Q.; Lima, D. B. C.; Silva, H. V. R.; Mota-Filho, A. C.; Martins, J. A. M.; Rodriguez-Villamil, P.; Moura, A. A.; Silva, L. D. M. Proteomic characterization of canine seminal plasma. *Theriogenology* 2017;95:178-186.

[65] Mogielnicka-Brzozowska, M.; Prochowska, S.; Niżański, W.; Bromke, M. A.; Wiśniewski, J.; Olejnik, B.; Kuzborska, A.; Fraser, L.; Młynarz, P.; Kordan, W. Proteome of cat semen obtained after urethral catheterization. *Theriogenology* 2020;141:68-81.

[66] Calman, D. F. F. Proteômica dos espermatozóides e plasma seminal de gatos domésticos: uma nova perspectiva para o entendimento das funções espermáticas. 2020. TCC (Graduação em Medicina Veterinária) – UNESP, Botucatu, 2020.

[67] Silva, M. K. Efeito do controle de luz sobre as características espermáticas e proteômica do sêmen de perdizes (*Rhynchotus rufescens*). 2020. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, 2020.

Comportamiento sexual del carnero

Rodolfo Ungerfeld
rungerfeld@gmail.com

Departamento de Biociencias Veterinarias,
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

Abstract: Ram sexual behavior has a direct, strong, influence in the flock reproductive efficiency, including pregnancy rate. The ability of individual rams to search and identify effectively females in heat, mate and impregnate them is directly related with the reproductive performance. In this review, two main topics are presented and discussed: the influence of different environmental factors during lamb development on the sexual behavior when those animals are adults, and the influence of the social relationships, especially dominance, on rams' sexual behavior. In general, it is highlighted the lack of enough knowledge on the determinants of individual ramas' sexual performance.

Keywords: sexual behavior, libido, dominance

Palavras-chave: comportamento sexual, libido, dominancia

Introducción

Para que los procesos reproductivos sean exitosos se requiere una buena coordinación, no sólo de los mecanismos endócrinos entre sí, sino también entre éstos y los mecanismos comportamentales. En el caso de los carneros, un desempeño sexual adecuado implica que se pueda detectar a las hembras que están receptivas, montarlas y preñarlas, que esto ocurra en la mayor cantidad de hembras posible, y en el caso de reproductores utilizados para colecta de semen, que se logre colectar la mayor cantidad de dosis de alta calidad en el menor tiempo posible. Entre otras cosas, esto implica comprender profundamente los mecanismos que determinan el comportamiento sexual, y como diferentes factores externos, como las interacciones sociales, los cambios estacionales, o la alimentación pueden modificarlos.

En este contexto, es importante compender la base del comportamiento sexual de la especie para poder manejarla y modificarla de acuerdo a los objetivos productivos. Por ello es necesario tener presente que los machos deben desarrollar estrategias que les permitan acceder a las hembras durante el corto período en que estas son receptivas. Esto determina que tanto la proporción de montas como la de preñeces sean muy desiguales entre diferentes individuos. Por tanto, los carneros desarrollaron estrategias de competencia premonta, es decir, para acceder a las hembras, las que difieren entre individuos, su ubicación en el rango social, experiencia sexual, etc.

Comportamiento sexual de los carneros

El comportamiento sexual tiene componentes motivacionales –habitualmente denominados libido- y de ejecución, que incluyen las actividades motoras desencadenadas como consecuencia de la motivación. Una comprensión adecuada de los factores que determinan y/o modulan la motivación permite aumentar la eficiencia de redirigirla hacia otros objetivos, como ocurre cuando se colecta semen en una vagina artificial.

Una vez que los carneros son introducidos a un grupo de hembras comienza la búsqueda para determinar que hembras están en celo. Uno de los primeros comportamientos del macho es el flehmen, que también se da en los toros, chivos y caballos [1]. El macho levanta el labio superior y huele el aire, exponiendo a un mayor contacto con el aire al órgano vómero-nasal. Esto tiene dos efectos: aumentar su libido al ser estimulado por feromonas presentes provenientes de hembras en celo [2], y determinar cuáles hembras están en celo y cuáles no.

Los carneros comienzan a recorrer la majada, recorriendo individualmente a las hembras. En primer término, olfatea la vulva, tras lo cual es común que la oveja orine. El carnero lleva orina con la lengua contra su paladar, poniéndola en contacto directo con la entrada del conducto palatino, que conduce sustancias volátiles hacia el órgano vómero-nasal, con lo cuál determina si esa hembra está o no en celo. Si la hembra no está en celo, no intenta montarla y sigue recorriendo otras ovejas de la majada. Si la hembra está en celo o está por comenzar su celo, el carnero despliega los comportamientos premonta, lo que incluye el contacto de la nariz del macho con la región anogenital de la hembra, aproximaciones por detrás y luego laterales en las que carga y empuja el cuerpo de la hembra, movimientos con exteriorización de la lengua intercalados o formando parte del flehmen, la emisión de vocalizaciones de baja intensidad, y movimientos de las manos sobre el flanco de la hembra [3]. Recién una vez que la hembra se queda quieta intenta montarla.

La monta es muy rápida, pudiendo producirse la erección y la protrusión del pene antes de la monta, seguido de la intromisión en un solo movimiento pélvico. El proceso dura 2-3 s, finalizando con el "golpe de riñón indicativo de la eyaculación, y luego el desmonte. Los movimientos de la la cola de la oveja facilitan la intromisión y evitan penetraciones anales [4]. Esto es seguido del periodo refractario, periodo durante el cuál los carneros no retoman su actividad de cortejo en forma espontánea. El control de la duración del período refractario en el macho es importante cuando se extrae semen para programas de inseminación artificial. La duración del mismo varía de acuerdo a múltiples factores, como el tiempo desde la actividad sexual anterior previa, la edad del macho, lo novedosa y atractiva de la hembra presentada y la cantidad de eyaculados previos. Es importante diferenciar el período poscopulatorio de que un animal esté sexualmente exhausto, ya que el período refractario forma parte normal del comportamiento durante el período en que el animal aún no está satisfecho. Este periodo se reduce en los carneros al moverlos, si olfatean semen de otro macho, por el "efecto Coolidge" (introducir una nueva hembra al corral) [5,6,7]. En cambio, cuando el animal está sexualmente saciado, la presencia de nuevos estímulos no provoca una respuesta inmediata.

Desarrollo de los corderos y comportamiento sexual

Además de los factores genéticos, varios factores ambientales pueden modular el desarrollo del comportamiento sexual. Entre estos, se demostró un rol central de la estación de partos, del ambiente social en que se cría a los corderos, y el vínculo con su madre. La pubertad se alcanza cuando los animales llegan a una edad y pesos mínimos, que además coincidan con la estación reproductiva [8]. Sin embargo, incluso en razas de corderos tradicionalmente caracterizadas como no estacionales se observan diferencias en el desarrollo reproductivo de acuerdo a la estación de nacimiento. En efecto, los corderos Santa Cruz que nacen en primavera son más precoces que los nacidos en verano u otoño, y estas diferencias no se vinculan con la cantidad ni la calidad del alimento recibido [9]. Es importante señalar que las diferencias se manifiestan con especial importancia en el desarrollo del comportamiento sexual, el que se desarrolla más tempranamente y a mayor velocidad en los corderos nacidos en primavera que en aquellos nacidos en las otras estaciones incluso en razas tradicionalmente caracterizadas como no estacionales.

El ambiente social en que se crían los corderos influye fuertemente sobre su desarrollo reproductivo, pero también sobre su desempeño sexual cuando adultos. Por ejemplo, los carneros que fueron criados sin contacto con hembras demoran más en aprender a eyacular en una vagina artificial para la colección de semen [10]. Además, los que fueron criados cerca de hembras alcanzan un mayor tamaño testicular y mayores concentraciones de testosterona que los que fueron criados aislados de las mismas [11]. El contacto temprano de los corderos con hembras favorece su desempeño sexual cuando adultos, aunque no evita que algunos machos muestren preferencias homosexuales [12]. Zenchak y Anderson [13] reportaron que los carneros criados en grupos monosexuales demuestran poco interés en las hembras cuando llegan a su etapa adulta. A su vez, los carneros que exhibieron niveles altos de actividad sexual dentro de su grupo de cría prefieren otros machos en lugar de ovejas en celo en test sexuales de preferencia [14]. Además, en varios trabajos se comprobó que los corderos y los cabritos que fueron criados con hembras logran una mayor capacidad de servicio cuando llegan a adultos [15,16,17, 18]. Sin embargo, los carneros Awassi no tuvieron mejor desempeño sexual al alcanzar la pubertad por el hecho de haber sido criados con hembras [19], por lo que es posible que el efecto se relacione con otros aspectos del desarrollo.

La posición jerárquica que alcanzan los individuos durante su desarrollo también influye fuertemente en el despliegue de su comportamiento sexual, e incluso tiene consecuencias en la vida adulta. Los corderos de alto rango social crecen más y maduran sexualmente antes que los de bajo rango [20], aunque las consecuencias del estrato social durante el desarrollo tienen pocas consecuencias cuando los carneros son adultos [21].

La madre influye en forma directa en el éxito reproductivo futuro de la cría ya que sus cuidados son determinantes de la probabilidad de supervivencia de la misma [22,23,24]. Durante el período inmediato al parto se establece un vínculo fuerte y selectivo entre la oveja y su cordero [25]. Luego de que finaliza este corto período inmediato al parto, las madres rechazan agresivamente las crías que no identificaron como propias. El vínculo de los corderos con su madre es determinante incluso de las preferencias sexuales que estos tienen

cuando adultos, ya que los corderos que fueron criados por cabras durante su desarrollo temprano, prefieren montar cabras que ovejas cuando llegan a los 3-4 años de vida a pesar de haber estado en contacto con ovinos el resto de su vida [26]. Sin embargo, la importancia de la madre no depende solamente de la especie, sino de la madre en sí misma. Al-Nakib *et al.* [27] observaron que los corderos criados por sus madres presentaron un desarrollo sexual más temprano y un retraso en el interés sexual por ovejas en celo con respecto a los corderos criados artificialmente. En el mismo sentido, los corderos que fueron criados por su madre despliegan el comportamiento sexual más tempranamente que los criados artificialmente [28], diferencia que se mantiene por lo menos hasta los dos años de edad [29]. Además, el haber sido criados o no por su madre también afectó la capacidad de competir con otros carneros por el acceso a hembras en celo [30]. Todo esto demuestra que el vínculo con la madre es uno de los determinantes del futuro desempeño reproductivo de los carneros y cabritos, concepto que habitualmente no es considerado durante el período de desarrollo de los mismos. Además, no es claro si la intensidad del vínculo en sí mismo tiene consecuencias sobre el desarrollo sexual de los mismos.

Jerarquía, dominancia, y desempeño sexual

El número de ovejas que cada carnero pueda aparear con éxito determina la contribución individual de cada macho a la fertilidad general de la majada. Asimismo, el número de ovejas montadas con éxito en condiciones de campo y el período en el que ellas son montadas están bajo la influencia de varios factores, como el comportamiento sexual de los carneros y las interacciones sociales entre ellos [31]. La dominancia y la competencia entre carneros modulan el despliegue del comportamiento sexual, y por tanto, influyen directamente en el éxito reproductivo de los mismos. Si bien hace muchos años Fowler y Jenkins [32] demostraron que cuando el carnero de mayor rango jerárquico es infértil, la tasa de preñez de la majada disminuye marcadamente aunque los carneros de menor rango sean fértiles. Básicamente, los carneros de mayor rango social monopolizan el acceso a las hembras [33], dificultando el acceso de los de menor rango, los que deben desarrollar otras estrategias sexuales. Sin embargo, llamativamente, esta es una temática donde los avances científicos han sido escasos, y donde quedan muchas interrogantes importantes por dilucidar.

El establecimiento de las relaciones de dominancia entre individuos desconocidos implica un aumento de las agresiones físicas y sexuales, lo que es muy estresante para todos los animales involucrados [34]. Además, implica como consecuencia el desarrollo de nuevas estrategias para el acceso a las hembras en función de la ubicación en el rango social. En confinamiento, la sola presencia de un carnero dominante puede suprimir el comportamiento sexual de un subordinado, incluso sin contacto directo ("audience effect") [35]. En condiciones de campo a menudo los carneros de mayor rango acceden a más ovejas en celo que los de rango menor. Sin embargo, el comportamiento sexual desplegado frente a las ovejas puede ser una señal de reafirmación de la dominancia [36], ya que los carneros de rango medio montan repetidamente ovejas que no están en celo ante la presencia de carneros

de rango bajo, pero este mismo efecto no se observa en los carneros de rango alto cuando están en presencia de carneros de rango medio o bajo.

Esto reafirma que es importante no solo conocer los comportamientos, sino también comprender el contexto en que se despliegan los mismos. Por ejemplo, durante años se sostuvo que los carneros no aumentan el despliegue sexual luego de observar la monta de otros carneros [37], como si ocurre en chivos y toros [38,39,40]. Sin embargo, recientemente Ungerfeld *et al.* [41] observaron que, si bien los carneros dominantes no modifican su comportamiento luego de observar o no la monta de otros carneros, los carneros subordinados despliegan montas oportunistas luego de observar la monta de carneros dominantes si los mismos eran retirados. Entre otros aspectos, esto permite realizar la colecta de semen en forma mucho más eficiente en grupos pequeños de carneros, con estructuras de dominancia estables.

Existen datos que fundamentan que cuando carneros de alto y bajo rango jerárquico compiten en "tests" por ovejas en celo, las expresiones de comportamiento de cortejo decrecen, y todos los carneros modifican su estrategia de monta [42]. En este trabajo también se observó que cuando los carneros de alto rango social estaban solos con una oveja en celo, el número de montas y montas con eyaculación observadas fue menor que en los de bajo rango en iguales condiciones. Sin embargo, en pruebas que incluyen la competencia con otro carnero, el número de montas y montas con eyaculación disminuyó en los de bajo, pero no fue afectado en los carneros de alto rango. Los carneros de bajo rango fueron más efectivos que carneros de alto rango al montar ovejas en celo. Sin embargo, en las pruebas en que los carneros compiten entre sí, aunque todos los carneros modifican sus estrategias de cortejo, los carneros de bajo rango fueron más afectados por la presencia de carneros de alto rango que los carneros de alto por la presencia de carneros de bajo rango. Estas modificaciones en la estrategia sexual son similares a lo largo del año, variando en magnitud, pero no en intensidad [43]. Sin embargo, Aguirre *et al.* [44] observaron que, en razas muy poco estacionales, el foroperiodo afecta más a los carneros dominantes que a los subordinados.

En síntesis, si bien existe abundante información sobre el tema, es claro que es necesario profundizar en las estrategias que desarrollan diferentes carneros para acceder a las hembras en celo, y por tanto como esto puede ser utilizado en los manejos prácticos.

Consideraciones finales

La conducta sexual de los carneros tiene componentes genéticos, pero también fuertes influencias ambientales. Estas últimas están relacionadas a la evolución de la especie, e incluyen muchos factores que pueden afectar el desarrollo del comportamiento sexual, con importantes consecuencias en el desempeño cuando los animales llegan a la vida adulta. A su vez, durante la vida adulta, factores como la estacionalidad, y la interacción con otros carneros, pueden condicionar totalmente el desempeño sexual de los carneros. Esto tiene consecuencias en la distribución de las preñeces en una majada, pero también en las estrategias utilizadas para la colección de semen, pero habitualmente son poco incorporadas en la consideración de los manejos reproductivos.

Referencias bibliográficas

[1] Hart, B. L. Roles of the olfactory and vomeronasal systems in behavior. Vet Clin North Am: Food Anim Pract 1987;3:463-475.

[2] Ungerfeld, R.; Ramos, A.; Möller, R. Role of the vomeronasal organ on ram's courtship and mating behaviour, and on mate choice among oestrous ewes. Appl Anim Behav Sci 2006;99:248-252.

[3] Orihuela, A. Ram's sexual behavior. Review. Rev Mex Cienc Pecu. 2014;5:49-89.

[4] Fierros-García, A.; Ungerfeld, R.; Aguirre, V.; Orihuela, A. The tail in tropical hair ewes (*Ovis aries*) that are in estrus is used as a proceptive signal and favors ram' copulation. *Anim Reprod Sci* 2018;195:65-70.

[5] Lezama, V.; Orihuela, A.; Angulo, R. Effect of restraining rams or change of the stimulus ewe on the libido and semen quality of rams. Small Rum Res 2003;49:219-222.

[6] Lezama, V.; Orihuela, A.; Angulo, R. Sexual behavior and semen characteristics of rams exposed to their own semen or semen from a different ram on the vulva of the ewe. Appl Anim Behav Sci 2001;75:55-60.

[7] Prado, V.; Orihuela, A.; Lozano, S.; Pérez-León, I. Effect on ejaculatory performance and semen parameters of sexually-satiated male goats (*Capra hircus*) after changing the stimulus female. *Theriogenology* 2003;60:261-267.

[8] Foster, D. L.; Hileman, S. M. Puberty in the Sheep. In: Plant TM, Zeleznik AJ, editors. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition) 4. San Diego: Academic Press; 2015. pp. 1441–1485.

[9] Sánchez-Dávila, F.; Ungerfeld, R.; del Bosque-González, A. S.; Bernal-Barragán, H. Seasonality in Saint Croix male lamb reproductive development in northern Mexico. *Reprod Dom Anim* 2018;54:391-400.

[10] Casteilla, L.; Orgeur, P.; Signoret, J. P. Effects of rearing conditions on sexual performance in the ram: practical use. *Appl Anim Behav Sci* 1987;19:111-118.

[11] Illius, W.; Hayes, N. B.; Lamming, G. E. Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behavior in the ram in different social environment. *J Reprod Fert* 1976;48:25-32.

[12] Katz, L. S.; Price, E. O.; Wallach, S. J. R.; Zenchak, J. J. Sexual performance of rams reared with or without females after weaning. *J Anim Sci* 1988;66:1166-1173.

[13] Zenchak, J. J.; Anderson, G. C. Sexual performance levels of rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *J Anim Sci* 1980;50:167-174.

[14] Zenchak, J. J.; Anderson, G. C.; Schein, M. W. Sexual partner preference of adult rams (*Ovis aries*) as affected by social experiences during rearing. *Appl Anim Ethol* 1981;7:157-167.

[15] Price, O. E.; Estep, D. Q.; Wallach, S. J. R.; Dally, M. R. Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. *J Anim Sci* 1991;69:1047-1052.

[16] Price, E. O.; Borgwardt, R.; Blackshaw, J. K.; Blackshaw, A.; Dally, M. R.; Erhard, H. Effect of early experience on the sexual performance of yearling rams. *Appl Anim Behav Sci* 1994;42:41-48.

[17] Price, O. E.; Borgwardt, R.; Dally, M. R. Heterosexual experience differentially affects the expression of sexual behavior in 6- and 8-month-old ram lambs. *Appl Anim Behav Sci* 1996;46:193-199.

[18] Stellflug, J. N.; Lewis, G. S. Effect of early and late exposure to estrual ewes on ram sexual performance classifications. *Anim Reprod Sci* 2007;97:295-302.

[19] Kridli, R. T.; Al-Yacoub, A. N. Sexual performance of Awassi rams lambs reared in different sex composition groups. *Appl Anim Behav Sci* 2006;96:261-267.

[20] Ungerfeld, R.; González-Pensado, S. P. Social rank affects reproductive development in male lambs. *Anim Reprod Sci* 2008;109:161-171

[21] Ungerfeld, R.; Lacuesta, L. Social rank during pre-pubertal development and reproductive performance of adult rams. *Anim Reprod Sci* 2010;121:101-105.

[22] Nowak, R.; Keller, M.; Lévy, F. Mother–young relationships in sheep: a model for a multidisciplinary approach of the study of attachment in mammals. *J Neuroendocrinol* 2011;23:1042-1053.

[23] Nowak, R.; Porter, R. H.; Lévy, F.; Orgeur, P.; Schaal, B. Role of mother-young interactions in the survival of offspring in domestic mammals. *Rev Reprod* 2000; 5:153-163.

[24] Dwyer, C. M. Maternal behaviour and lamb survival: from neuroendocrinology to practical application. *Animal* 2014;8:102-112.

[25] Poindron, P.; LeNeindre, P. Endocrine and sensory regulation of maternal behavior in the ewe. *Adv St Behav* 1980;11:75-119

[26] Kendrick, K. M.; Hinton, M. R.; Atkins, K. Mothers determine sexual preferences. *Nature* 1998;395:229-230.

[27] Al-Nakib, F. M. S.; Lodge, G. A.; Owen, J. B. A study of sexual development of ram lambs. *Anim Prod* 1986;43:459-468.

[28] Damián, J. P.; Beracochea, F.; Hötzel, M. J.; Banchero, G.; Ungerfeld, R. Reproductive and sexual behaviour development of dam or artificially reared male lambs. *Physiol Behav* 2015;147:47-53.

[29] Damián, J. P.; Beracochea, F.; Machado, S.; Hötzel, M. J.; Banchero, G.; Ungerfeld, R. Growing without a mother results in poorer sexual behaviour in adult rams. *Animal* 2017;12:98-105.

[30] Damián, J. P.; Hötzel, M. J.; Banchero, G.; Ungerfeld, R. Competition for oestrous ewes between rams reared by their mothers or artificially reared: Effects on sexual behaviour and testosterone and cortisol serum concentrations. *Theriogenology* 2017;100:134-138.

[31] Tilbrook, A. J.; Cameron, A. W. N. The contribution of the sexual behavior of rams to successful mating of ewes under field conditions. En: Oldham, C. M.; Martin, G. B.; Purvis I. W.; Reproductive physiology of Merino sheep. Concepts and consequences. School of Agriculture (Animal Science). The University of Western Australia, 1990. p. 143-157.

[32] Fowler, D. G.; Jenkins, L. D. The effets of dominance and infertility of rams on reproductive performance. *Appl Anim Ethol* 1976;2:327-337.

[33] Lovari, S.; Ale, S. B. Are there multiple mating strategies in blue sheep? *Behav Proc* 2001;53:131–135.

[34] Lacuesta, L.; Ungerfeld, R. Sexual performance and stress response of previously unknown rams after grouping them in dyads. *Anim Rep Sci.* 2012;134:158-163.

[35] Lindsay, D. R.; Dunsmore, D. G.; Williams, J. D.; Syme, G. J. Audience effects on the mating behaviour of rams. *Anim Behav* 1976;24:818–821.

[36] Ungerfeld, R. Sexual behavior of medium-ranked rams toward non-estrual ewes is stimulated by the presence of low-ranked rams. J Vet Behav: Cl Appl Res 2012;7:84-87.

[37] Price, E. O.; Wallach, S. J. R.; Dally, M. R. Effects of sexual stimulation on the sexual performance of rams. *Appl Anim Behav Sci* 1991;30:333–340.

[38] Blockey, M. A. Development of a serving capacity test for beef bulls. *Appl Anim Ethol* 1981;7:307–319.

[39] Mader, D. R.; Price, E. O. The effects of sexual stimulation on the sexual performance of Herford bulls. *J Anim Sci* 1984;59:294–300.

[40] Price, E. O.; Smith, V. M.; Katz, L. Sexual stimulation of male dairy goats. *Appl Anim Behav Sci* 1984;13:83–92.

[41] Ungerfeld, R.; Orihuela, A.; Pérez-Clariget, R. Sexual behavior of subordinate, but not dominant, rams increases following observed sexual activity. *Theriogenology* 2019;129:99-102.

[42] Ungerfeld, R.; González-Pensado, S. P. Social dominance and courtship and mating behavior in rams in non-competitive and competitive pen tests. *Reprod Dom Anim* 2008;44:44-47.

[43] Ungerfeld, R.; Lacuesta, L. Competition between different social ranked-rams has similar effects on testosterone and sexual behavior throughout the year. Rep Dom Anim. 2015;50:1022- 1027.

[44] Aguirre, V.; Orihuela, A.; Vázquez, R. Seasonal variations in sexual behavior, testosterone, testicular size and semen characteristics, as affected by social dominance, of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Anim Sci J*. 2007;78:417-423.

MicroRNAs em espermatozoides: origem e seus papéis na fertilidade

Maíra Bianchi Rodrigues Alves
maira.bianchi.alves@usp.br
Rubens Paes de Arruda
Laura Nataly Garcia-Oliveiros
Juliano Coelho da Silveira
Felipe Perecin
Eneiva Carla Carvalho Celeghini
Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP

Abstract: Since spermatozoa are highly specialized cells that display distinctive characteristics, as little amount of cytoplasm and an extremely condensed DNA, these cells were considered as presenting a unique function: delivery a proper DNA to the embryo. However, sperm have been recognized recently as a pivotal contributor to embryo development with several types of molecules and organelles. Consequently, the sperm quality concept was updated to include also intrinsic attributes to the standard structural and morphofunctional, which complete the characterization of a "healthy sperm", i.e., a sperm with high fertility potential. Thus, sperm should display suitable structure, motility, membrane integrity, and also specific proteins, organelles, and RNAs. Given microRNAs are important during spermatogenesis, sperm maturation, and post- epididymal events, the contribution of sperm-borne microRNAs to embryo development has gained much attention. This review makes advances in the role of sperm microRNA during the sperm journey and their potential use as diagnosis and therapy.

Keywords: miRNAs, sperm quality, semen, embryo.

Palavras-chave: miRNAs, qualidade espermática, sêmen, embrião.

Introdução

A busca pelo sucesso reprodutivo impacta diretamente aspectos afetivos no tocante aos animais de companhia e humanos, bem como aspectos econômicos, quando se refere aos animais de produção. Em humanos, 50% dos problemas de fertilidade que acometem de 10% a 15% dos casais em idade fértil envolve fatores ligados aos homens; destes, 30% permanece sem diagnóstico mesmo utilizando dosagens hormonais e técnicas atuais para avaliação da qualidade espermática [1]. Em animais de produção, a busca por métodos que consigam predizer com alta acuidade o potencial fértil de amostras espermáticas poderia trazer grandes ganhos para os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), por meio da seleção de doses de sêmen com potencial fértil elevado [2]. No entanto, a validação de um único atributo espermático para prever o potencial fértil espermático é improvável [3], visto

que o espermatozoide precisa apresentar diversas características para ter habilidade fértil e ser considerado um espermatozoide "saudável" [4].

Os atributos espermáticos que caracterizam espermatozoides como "saudáveis" (do inglês, "healthy sperm") podem ser agrupados em atributos espermáticos estruturais, morfo- funcionais e intrínsecos (revisado por Alves *et al.*, 2020) [5]. Os atributos espermáticos estruturais assinalam a estrutura típica do espermatozoide em cabeça e flagelo. Os atributos morfo- funcionais, por sua vez, qualificam os espermatozoides quanto às características de forma e função, avaliando, por exemplo, a motilidade e morfologia espermáticas bem como a integridade dos componentes dos espermatozoides tais como membranas e DNA. Por fim, os atributos intrínsecos consideram o conteúdo molecular e de organelas do espermatozoide, tais como proteínas, RNAs e centríolos, que cada vez mais demonstram importância para a habilidade fértil espermática. Dessa forma, quanto mais características forem avaliadas em uma amostra espermática, espera-se que maior seja a precisão no diagnóstico do potencial fértil [3,5]. No entanto, visto que muitas características não são contempladas nos métodos diagnósticos de rotina, ou mesmo permaneçam desconhecidas, somente a utilização das amostras espermáticas em programas de monta natural ou inseminação artificial a campo pode, de fato, apontar a real taxa de fertilidade das mesmas [6].

Atualmente, tanto em clínicas de reprodução assistida quanto em centrais de colheita e processamento de sêmen, as amostras espermáticas são rotineiramente avaliadas quanto à concentração, motilidade e morfologia espermáticas, compreendendo parte do grupo de atributos espermáticos morfo-funcionais. Embora em alguns laboratórios, as amostras também sejam avaliadas quanto às outras características morfo-fucionais, tais como integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e integridade do DNA, de forma geral, essas características são avaliadas em amostras que apresentem alguma indicação, ou seja, quando resultam em redução da taxa de prenhez, mesmo apresentando motilidade e morfologia adequadas [2,7]. De fato, é crescente o número de amostras que mesmo avaliadas e consideradas satisfatórias para uma ampla gama de caraterísticas morfo--funcionais, podem não gerar taxas de prenhez adequadas. Neste contexto, os fatores intrínsecos têm chamado cada vez mais atenção por completarem o conceito de espermatozoide "saudável". Dentre os fatores intrínsecos, as moléculas de microRNAs (miRNAs) espermáticas têm se destacado por mostrar forte impacto sobre o potencial fértil masculino [8,9]. Assim, nesta revisão abordaremos aspectos dessas moléculas nos espermatozoides abrangendo o histórico, biossíntese e mecanismo de ação dos miRNAs, bem como os processos pelos quais os miRNAs são adquiridos pelos espermatozoides, como atuam nessas células e quais as perspectivas futuras.

Histórico, biossíntese e mecanismo de ação dos miRNAs

Os miRNAs foram descritos pela primeira vez no início da década de 90 durante o desenvolvimento larval do organismo *Caenorhabditis elegans* [10,11]. Em espermatozoides, embora moléculas de RNAs tenham sido descritas no início na década de 70 [12,13], a confirmação da presença de RNAs somente se deu posteriormente [14,15]. Em seguida, pelo

melhor do nosso conhecimento, as pequenas moléculas de miRNAs somente foram confirmadas em espermatozoides a partir de 2010 [8]. Posteriormente a este primeiro relato, outros estudos começaram a mostrar a importância dos miRNAs para as células espermáticas [9]. Em paralelo, estudos induzindo o bloqueio da síntese de miRNAs demonstravam efeitos deletérios sobre a espermatogênese e maturação espermática [16,17]. Da mesma forma, o maior desenvolvimento das técnicas para avaliação do conteúdo molecular de miRNAs em diferentes tipos celulares trouxe como conhecimento que espermatogônias, espermatócitos e espermátides, bem como espermatozoides, isolados da cabeça, corpo ou cauda do epidídimo, apresentam diferentes perfis de miRNAs [18,19]. Por fim, mimetizadores e inibidores de miRNAs específicos passaram a indicar o papel dessas moléculas no espermatozoide [8].

Os miRNAs recebem esse nome por serem caracterizados por uma fita simples de RNA contendo cerca de 18 a 22 nucleotídeos [20]. Diferentemente dos RNAs mensageiros, os miRNAs são estáveis, além de serem conservados quanto à forma e função entre as diferentes espécies e não codificarem proteínas. Essas moléculas, também chamadas de RNA de interferência (RNAi) ou ainda não codificadores de proteínas (ncRNA), atuam basicamente interferindo no processo de tradução de proteínas [20]. A biossíntese dos miRNAs geralmente é realizada a partir da codificação de regiões exônicas ou intrônicas do DNA em miRNAs primários (pri-miRNA) pela enzima RNA polimerase II. Em seguida, os pri-miRNAs perdem a 7- metilguanina (CAP) da extremidade 5' e a poliadenilação da extremidade 3' pela ação do complexo Drosha-DGCR8 (*cropping*), passando a serem chamados de miRNA precursores (pre- miRNAs). Os pre-miRNAs são transportados do núcleo ao citoplasma pela proteína Exportina-5, onde perdem a estrutura em grampo (*Hairpin*) pela clivagem da enzima Dicer (*dicing*) e, originam pequenas moléculas de miRNAs de fita dupla com aproximadamente 22 nucleotídeos [20,21]. Embora apresentem o tamanho final de miRNA, a ação dos miRNAs somente ocorrerá quando estiverem em fita simples; esse processo ocorre após a ligação dos miRNAs com proteínas do tipo Argonautas. De maneira resumida, quando o miRNA de fita dupla se liga a esse complexo proteico formado inclusive por proteínas chaperonas (HSC70/HSP90), há liberação de uma das fitas. A fita que continua ligada às Argonautas passa a ser chamada madura e forma então o complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA) que de fato atuará sobre moléculas de RNA mensageiro (mRNA) de duas formas distintas: (1ª) quando o pareamento entre a região *seed* do miRNA maduro e a região 3'UTR do mRNA for perfeito, ocorrerá a clivagem do RNA mensageiro; e (2ª) quando o pareamento entre a região *seed* do miRNA maduro e a região 3'UTR do mRNA for imperfeito, ocorrerá o bloqueio da tradução do RNA mensageiro sem a degradação do mesmo. Em animais, o último mecanismo é mais comumente observado. Assim, mesmo que o mRNA esteja presente na célula e tenha sido transcrito, os miRNAs são capazes de afinar e regular o mecanismo de ação destas moléculas de forma importante para que eles não sejam traduzidos em proteínas, atuando como mecanismo fino da expressão gênica. Interessantemente, um único miRNA pode regular diversos transcritos-alvo; da mesma forma, um único transcrito-alvo pode ser regulado por diversos miRNAs [20,22,23].

Outra questão de extrema relevância sobre a ação dos miRNAs, principalmente em espermatozoides, é que estes podem atuar tanto na célula em que foram gerados (denominado

de célula de origem) como em outros tipos celulares (denominados de células-alvo). Os miRNAs podem ser liberados da célula de origem de forma livre, ligados a moléculas específicas ou ainda inseridos em vesículas extracelulares (revisado por Raposo & Stoorvogel, 2013) [24], que constitui o principal mecanismo conhecido de transferência de miRNAs. Atualmente, são descritas duas classes de vesículas extracelulares: as microvesículas e os exossomos. Essas estruturas possuem papel-chave na comunicação celular, sendo liberadas em situações de estresse com conteúdo não regulado no caso das microvesículas ou, ainda, altamente regulado como os exossomos. Os exossomos são amplamente descritos e estudados em fluidos corpóreos tais como o plasma seminal por poderem transferir miRNAs, mRNAs e proteínas aos espermatozoides. No fluido epididimário, estes são chamados de epididimossomos com tamanho variando de 50 a 250 nm [25] e desempenham papel importante na maturação espermática pela transferência de moléculas, principalmente proteínas [26,27]. Recentemente, os epididimossomos têm se mostrado altamente regulados nos diferentes segmentos epididimários apresentando diferentes perfis de miRNAs [28] e sendo capazes de interagir de forma evidente com os espermatozoides [29].

MicroRNAs em espermatozoides

Os espermatozoides são células altamente especializadas na entrega do material genético paterno ao oócito. Neste contexto, as células espermáticas são leves e desprovidas de abundante conteúdo citoplasmático, bem como possuem DNA protegido e que ocupa pouco espaço pela alta condensação. Ambos processos ocorrem, respectivamente, pela perda do citoplasma e substituição das histonas por protaminas (protaminação) na etapa final da espermatogênese, a espermiogênese [4]. Pela presença dessas características ímpares, que decorrem em baixa capacidade de acúmulo (pelo limitado citoplasma) e de transcrição (pelo DNA altamente condensado), por muitos anos acreditou-se que os espermatozoides não possuíam conteúdo de transcritos. Estudos da década de 70 [12,13] foram pioneiros em descrever a presença de RNAs espermáticos. No entanto, achava-se que estes advinham de contaminações de células somáticas.

Atualmente, sabe-se que espermatozoides possuem tanto moléculas de proteínas quanto de RNAs adicionalmente ao DNA [15,30,31]. Dentre os RNAs, há uma gama de classes presentes nos espermatozoides tais como piwiRNAs, "tRNA-derived fragments" e os próprios miRNAs [32–35]. Pelo fato dos miRNAs serem pequenos, estáveis e conservados entre as espécies, bem como serem adquiridos por meio das vesículas extracelulares e terem funções conhecidas durante o desenvolvimento embrionário inicial, essas moléculas têm sido foco dos estudos dos atributos espermáticos intrínsecos. Atualmente, existem evidências bem consolidadas de que os miRNAs espermáticos variam fisiologicamente conforme o local do trato reprodutivo masculino em que são adquiridos pelos espermatozoides [19]. Da mesma forma, existem miRNAs espermáticos que alteram-se em condições de estresse [36–38] e conforme os fenótipos de fertilidade [39,40]. Dessa forma, o perfil de miRNAs espermático está intimamente associado com a qualidade molecular do espermatozoide sendo agrupado aos atributos intrínsecos para constituir adequada qualidade espermática. Nos próximos tó-

picos serão abordados como os miRNAs são adquiridos pelos espermatozoides bem como o mecanismo de ação deles no tocante aos processos reprodutivos com ênfase na andrologia.

Aquisição dos miRNAs pelos espermatozoides

Os miRNAs espermáticos são adquiridos pelos espermatozoides ao fim da espermatogênese, durante a passagem pelo epidídimo bem como durante a jornada espermática pós-epididimária [35]. Embora uma fração dos miRNAs espermáticos tenha origens que remontam à espermatogênese, acredita-se que o principal mecanismo para o acúmulo de miRNAs nos espermatozoides seja pela aquisição destas moléculas em diferentes segmentos do trato reprodutivo masculino durante o trânsito dos espermatozoides.

Durante a espermatogênese, os miRNAs são adquiridos no processo de espermiogênese previamente à substituição das histonas pelas protaminas. Neste contexto, os miRNAs são ativamente transcritos e acumulados de forma altamente regulada [35]. Após o fim da espermiogênese, em que se conclui a protaminação, o espermatozoide passa a ficar praticamente com capacidade nula de transcrever. Dessa forma, é importante o acúmulo regulado de miRNAs específicos para agirem em eventos futuros que o espermatozoide será submetido. Após o fim da espermatogênese, os espermatozoides já formados seguem para os epidídimos, onde irão adquirir motilidade e habilidade fértil no processo chamado de maturação espermática [41]. Durante a passagem pelos epidídimos, os espermatozoides também adquirem moléculas de miRNAs, principalmente por meio da transferência mediada pelas vesículas extracelulares liberadas de maneira regulada pelo epitélio epididimário [26,28]. Por fim, os espermatozoides adquirem miRNAs quando entram em contato com o plasma seminal liberado pelas glândulas sexuais acessórias, bem como durante o contato com fluidos do trato reprodutivo da fêmea como os presentes na tuba uterina [42–44].

Pelo limitado citoplasma, acredita-se que os miRNAs, adquiridos e acumulados pelos espermatozoides, possuam de fato funções importantes nos processos que o espermatozoide irá passar até fecundar o oócito. Ademais, recentemente os miRNAs espermáticos têm se mostrado importantes também para o desenvolvimento embrionário [8,9]. Nos próximos tópicos iremos abordar os conhecimentos atuais sobre o papel dos miRNAs espermáticos na maturação espermática, capacitação espermática e, por fim, no desenvolvimento embrionário inicial.

miRNAs na maturação e capacitação espermática

Embora após a espermatogênese, os espermatozoides deixem os testículos morfologicamente formados, é somente após a passagem pelos epidídimos que essas células adquirem capacidade de motilidade e habilidade fértil [41], por meio do processo de maturação espermática. O epidídimo consiste em um único túbulo longo e enovelado dividido em quatro segmentos: o segmento inicial (em roedores) e os segmentos cabeça, corpo e cauda, sendo que cada segmento apresenta características específicas histológicas e moleculares (revisado por Domeniconi *et al*., 2016) [45]. Durante o trânsito epididimário, os espermatozoides possuem contato com ampla variedade de alterações que ocorrem no microambiente epididimá-

rio, incluindo a liberação e absorção de fluidos, contato com diferentes íons e antioxidantes e, particularmente, comunicação com as vesículas extracelulares epididimárias conhecidas como epididimossomos [46], já abordadas anteriormente nesta revisão.

Os epididimossomos são liberados pelo epitélio epididimário ao lúmen interagindo com os espermatozoides [26,47]. A transferência de proteínas presentes no epididimossomos e relacionadas com a maturação espermática já é um processo bem conhecido [27,48]. Dessa forma, proteínas importantes para a aquisição da habilidade fértil espermática [27,48,49] já foram descritas nesta interação espermatozoide-epididimossomos. Da mesma forma, os epididimossomos transferem miRNAs aos espermatozoides de forma específica conforme o segmento epididimário [28,50,51]. Neste contexto, estima-se que cerca de 70% dos miRNAs estão presentes em vesículas extracelulares dos três segmentos epididimários (cabeça, corpo e cauda), enquanto aproximadamente 20% são exclusivos de vesículas extracelulares de um único segmento, e 10% são comuns às de vesículas extracelulares presentes em dois segmentos [28]. Em adição, miRNAs específicos são associados aos espermatozoides da cauda do epidídimo (*i.e.* miR- 208b-3p e -196b-5p), enquanto que outros são adquiridos durante a passagem dos espermatozoides pela cabeça e corpo (*i.e.* miR-204b-5p e -375-3p) [50]. Os miRNAs adquiridos exclusivamente pelo espermatozoide durante a passagem pela cauda do epidídimo parecem ser essenciais na determinação do potencial fértil espermático, tendo impacto sobre o desenvolvimento embrionário inicial [52]. Da mesma forma, subpopulações espermáticas com motilidade distinta (alta *vs*. baixa), característica adquirida durante a passagem pelos epidídimos, apresentam perfis diferentes de miRNAs [53]. Dessa forma, os miRNAs adquiridos durante a maturação espermática parecem ser essenciais para determinação do potencial fértil espermático. No entanto, mais estudos são necessários para mostrar especificamente os miRNAs e como eles realizam essa regulação.

O processo de capacitação espermática, que ocorre no trato reprodutivo da fêmea, especificamente na tuba uterina [54], é essencial para que o espermatozoide adquira competência em fecundar o oócito. Ao sair do epidídimo, o espermatozoide apresenta habilidade fértil, porém precisa passar pelo processo de capacitação espermática para adquirir esta competência [55,56]. Basicamente, o processo de capacitação envolve diversas cascatas proteicas relacionadas às vias da fosforilação da proteína tirosina, via de sinalização da proteína quinase A dependente do AMP cíclico (cAMP-PKA) [57], via da fosfatidilinositol 3- quinase (PI3K) [58] e a via da proteína quinase ativada por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases - MAPK) [59]. De forma geral, existem evidências claras de que os miRNAs atuam nessas vias. Durante a capacitação espermática, alterações no perfil de miRNAs de espermatozoides não capacitados, comparado ao perfil de miRNAs de espermatozoides capacitados, mostram que os miRNAs podem estar regulando essas vias também neste processo. Inclusive, miRNAs envolvidos na fosforilação da proteína tirosina tais como miR-151-3p e miR-1343, já foram descritos como alterados em diferentes modelos de capacitação espermática, sendo que o miR- 1343 mostrou-se altamente regulado em espermatozoides capacitados [60]. O miR-151-3p também foi associado aos eventos da capacitação estando relacionado com os canais catiônicos espermáticos "CatSper", os quais controlam a concentração intracelular principal-

mente de cálcio e a motilidade espermática [61]. Embora existam evidências que os miRNAs possuam ação durante a capacitação espermática, são necessários mais estudos em que se mostre o mecanismo de ação e se a ausência dos miRNAs afeta os processos de capacitação e a fertilidade.

miRNAs espermáticos no desenvolvimento embrionário inicial

Embora se saiba que espermatozoides carreguem miRNAs, o conhecimento sobre o papel e função das moléculas contidas nessas células ainda é escasso. Aos poucos, diferentes grupos de pesquisa têm sinalizado os diferentes processos em que os miRNAs espermáticos participam. Um desses processos, que se tem maior evidência atualmente, é a entrega de miRNAs ao oócito no momento da fecundação e regulação do desenvolvimento embrionário inicial. Esses miRNAs são chamados de "sperm-borne miRNAs" e hoje já se sabe que são fundamentais para completar a habilidade fértil do espermatozoide [9] (**Tabela 1**).

Por muitos anos achava-se que a única função do espermatozoide era levar o DNA ao oócito e isso era sustentado pelas próprias características espermáticas de ter pouco citoplasma e DNA altamente condensado. No entanto, aos poucos têm sido mostrado que os espermatozoides entregam proteínas como a PLC-zeta, fundamental para a ativação oocitária e progressão oocitária na meiose, processos chave para possibilitar a formação do pró-núcleo feminino [62]. Após, foi visto que os espermatozoides contribuem também com os centríolos [63,64] e parecem contribuir também com as mitocôndrias [65,66]. Recentemente, demonstrou- se que os miRNAs também são entregues dos espermatozoides aos oócitos durante a fecundação e regulam funções importante do desenvolvimento embrionário inicial (revisado por Alves *et al.*, 2020) [5]. Neste contexto, pelo melhor do nosso conhecimento, o primeiro miRNA a ser descrito como fundamental para o desenvolvimento embrionário inicial foi o miR-34c em camundongos, que ao ser inibido resultou em bloqueio da primeira clivagem [8]. Da mesma forma, o miR-449b também foi associado com maior taxa de primeira clivagem [67]. Já em estudos do nosso grupo de pesquisa, recentemente encontramos o miR-216b associado com menores taxas de primeira clivagem e menores níveis do gene-alvo de proliferação *K-RAS* em embriões produzidos com espermatozoides de touros de baixa fertilidade a campo [39]. Em amostras de espermatozoides humanos com qualidade espermática normal, mas com necessidade de terapias para infertilidade por técnicas de reprodução assistida, também foi encontrado miRNA alterado, o miR-191 [68]. Dessa forma, pode-se observar que o potencial dos miRNAs espermáticos para contribuir com o desenvolvimento embrionário inicial está cada vez mais claro e abre caminhos para o melhor entendimento dos fatores necessários para caracterizar um "espermatozoide saudável".

Tabela 1. Lista de "sperm-borne miRNAs" entregues pelo espermatozoide ao embrião.

Sperm- borne miRNA	Modelo	Impacto no desenvolvimento embrionário	Referência
miR-34c	Espermatozoides expressando ou não miR-34c usados para produção de embriões murinos por ICSI[1]	Maior taxa de primeira clivagem associada com a presença do sperm-borne miR-34c	Liu *et al.* (2012) [8]
miR-191	Espermatozoides normais de homens submetidos a tratamento de infertilidade por técnicas de reprodução assistida	Maior taxa de fecundação e maior qualidade dos embriões associada com a presença do sperm-borne miR-191	Xu *et al.* (2020) [68]
miR-216b	Espermatozoides de touros de alta e baixa fertilidade a campo	Menor taxa de primeira clivagem e menor expressão de *K-RAS* durante o desenvolvimento embrionário inicial associado com maiores níveis do sperm-borne miR-216b	Alves *et al.* (2019) [39]
miR-449b	Embriões bovinos produzidos por transferência nuclear de célula somática induzida a expressar o miR-449b	Maior taxa de primeira clivagem de embriões clone associada com a presença do sperm-borne miR-449b	Wang *et al.* (2017) [67]

[1]Injeção intracitoplasmática por espermatozoide

Perspectivas

Os miRNAs espermáticos possuem de fato importância nos atributos intrínsecos dos espermatozoides. Além de possuírem funções em processos importantes para determinação do potencial fértil tais como maturação, capacitação e desenvolvimento embrionário inicial, estudos recentes têm mostrado impacto dos miRNAs espermáticos sobre características da prole [36,37]. Além disso, estudos do nosso grupo de pesquisa mostraram recentemente que condições adversas tais como o estresse térmico [38] podem impactar o perfil dessas moléculas de miRNAs com eventuais consequências à fertilidade. Assim, os miRNAs podem vir a ser usados como ferramentas para diagnosticar amostras com baixo potencial fértil e, mesmo, virem a fornecer ferramentas para o desenvolvimento de novas terapias para casos idiopáticos de comprometimento da fertilidade.

Considerações finais

O potencial fértil e o sucesso na fertilidade dependem de diversos fatores. Dessa forma, fica muito claro que não se espera que os miRNAs venham a substituir as análises morfo- funcionais espermáticas. A execução dessas análises se faz fundamental para indicar o potencial fértil e direcionar o uso de amostras espermáticas. No entanto, a expectativa é que a partir dos conhecimentos gerados pelos estudos com os miRNAs espermáticos possam vir a serem encontradas moléculas associadas aos fenótipos de baixa fertilidade de amostras que as análises espermáticas morfo-funcionais são incapazes de detectar o baixo potencial fértil. Entretanto, continua havendo a limitação de que essas análises não individualizarão os espermatozoides.

Especialmente na bovinocultura, a abordagem do uso dos miRNAs como indicadores de amostras de baixo potencial fértil, que são aprovadas nos exames morfo-funcionais, tem alta chance em ser introduzida. A intensificação na seleção de bons reprodutores com qua-

lidade espermática superior tem gerado a insuficiência das análises morfo-funcionais atuais distinguirem amostras de alta e baixa fertilidade; isso ocorre pelo fato de as diferenças entre essas amostras serem mínimas. Assim, espera-se que os miRNAs espermáticos possam vir a complementar o exame dignóstico para esse grupo especial de amostras. Além disso, espera- se que os conhecimentos gerados pelos estudos com miRNAs espermáticos possam abrir caminhos para o desenvolvimento de novas terapias, especialmente para casos idiopáticos de infertilidade.

Referências bibliográficas

[1] Agarwal, A.; Mulgund, A.; Hamada, A.; Chyatte, M. R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 2015;13:1–9. doi:10.1186/s12958-015-0032-1.

[2] Celeghini, E. C. C.; Arruda, R. P. de; Florez-Rodriguez, S. A.; Dos Santos, F. B.; Alves, M. B. R.; Oliveira, B. M. M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos Impact of semen quality on field fertility in cattle. *Anim Reprod* 2017;41:40–5.

[3] Amann, R. P.; Hammerstedt, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 1993;14:397–406. doi:10.1002/j.1939-4640.1993.tb03247.x.

[4] Krawetz, S. A. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005;6:633–42. doi:10.1038/nrg1654.

[5] Alves, M. B. R.; Celeghini, E. C. C.; Belleannée, C. From sperm motility to sperm-borne microRNA signatures: new approaches to predict male fertility potential. *Front Cell Dev Biol* 2020;8:1–16. doi:10.3389/fcell.2020.00791.

[6] Arruda, R. P.; Celeghini, E. C. C.; Alonso, M. A.; Carvalho, H. F.; Oliveira L. Z.; Nascimento, J. *et al.* Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprodução Anim* 2011;35:145–51.

[7] Oliveira, B. M.; Arruda, R. P.; Thomé, H. E.; Maturana Filho, M.; Oliveira, G.; Guimarães, C. *et al.* Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology* 2014;82:767–72. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.06.007.

[8] Liu, W-M.; Pang, R. T. K.; Chiu, P. C. N.; Wong, B. P. C.; Lao, K.; Lee, K-F. *et al.* Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:490–4. doi:10.1073/pnas.1110368109.

[9] Yuan, S.; Schuster, A.; Tang, C.; Yu, T.; Ortogero, N.; Bao, J. *et al.* Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development* 2016;143:635–47. doi:10.1242/dev.131755.

[10] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin- 14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. Cell 1993;75:855–62. doi:10.1016/0092-8674(93)90530-4.

[11] Lee RC. The C . elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to & II-14 1993;75:843–54. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.

[12] Betlach C, Erickson R. A unique RNA species from maturing mouse spermatozoa. Nature 1973;242:114–5. doi:10.1038/242114a0.

[13] Paul J, Duerksen JD. Chromatin-associated RNA content of heterochromatin and euchromatin. Mol Cell Biochem 1975;9:9–16. doi:10.1007/BF01731728.

[14] Miller D, Briggs D, Snowden H, Hamlington J, Rollinson S, Lilford R, *et al.* A complex population of RNAs exists in human ejaculate spermatozoa: Implications for understanding molecular aspects of spermiogenesis. Gene, v. 237, n. 2, p. 385–392, 1999. Gene 1999;237:385–292.

[15] Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. Nature 2004;429:2603. doi:10.1038/nature02602.

[16] Papaioannou MD, Pitetti J-L, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, *et al*. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. Dev Biol 2009;326:250–9. doi:10.1016/j.ydbio.2008.11.011.

[17] Jerczynski O, Lacroix-Pépin N, Boilard E, Calvo E, Bernet A, Fortier MA, *et al*. Role of Dicer1-Dependent Factors in the Paracrine Regulation of Epididymal Gene Expression. PLoS One 2016;11:e0163876. doi:10.1371/journal.pone.0163876.

[18] Smorag L, Zheng Y, Nolte J, Zechner U, Engel W, Pantakani DVK. MicroRNA signature in various cell types of mouse spermatogenesis: Evidence for stage-specifically expressed miRNA-221, -203 and -34b-5p mediated spermatogenesis regulation. Biol Cell 2012;104:677–92. doi:10.1111/boc.201200014.

[19] Nixon B, Stanger SJ, Mihalas BP, Reilly JN, Anderson a. L, Tyagi S, *et al*. The MicroRNA Signature of Mouse Spermatozoa Is Substantially Modified During Epididymal Maturation. Biol Reprod 2015. doi:10.1095/biolreprod.115.132209.

[20] Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. Cell 2018;173:20–51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006.

[21] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;15:509– 24. doi:10.1038/nrm3838.

[22] Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol 2009;10:126–39. doi:10.1038/nrm2632.

[23] Silveira, J. da; Ávila, A. C. F. C. M. de; Garrett, H. L.; Bruemmer, J. E.; Winger, Q. A.; Bouma, G. J. Cell- secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation. *J Endocrinol* 2018;236:R15–27. doi:10.1530/JOE-17-0200.

[24] Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol 2013;200:373–83. doi:10.1083/jcb.201211138.

[25] Sullivan R. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. Asian J Androl 2015:726–9. doi:10.4103/1008-682X.155255.

[26] Belleannée C. Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. Asian J Androl 2015;17:730–6. doi:10.4103/1008- 682X.155532.

[27] Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. Asian J Androl 2007;9:483–91. doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x.

[28] Belleannée C, Calvo É, Caballero J, Sullivan R. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. Biol Reprod 2013;89:1–11. doi:10.1095/biolreprod.113.110486.

[29] Zhou W, Stanger SJ, Anderson AL, Bernstein IR, De Iuliis GN, McCluskey A, *et al*. Mechanisms of tethering and cargo transfer during epididymosome-sperm interactions. BMC Biol 2019;17:1–18. doi:10.1186/s12915-019-0653-5.

[30] Braundmeier AG, Miller DJ. The Search is on: Finding Accurate Molecular Markers of Male Fertility. J Dairy Sci 2001;84:1915–25. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74633-4.

[31] Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. Lancet 2002;360:772–7. doi:10.1016/S0140-6736(02)09899-9.

[32] Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz S a. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. Hum Reprod Update 2013;19:604–24. doi:10.1093/humupd/dmt031.

[33] Sharma U, Conine CC, Shea JM, Boskovic A, Derr a. G, Bing XY, *et al*. Biogenesis and function of tRNA fragments during sperm maturation and fertilization in mammals. Science (80-) 2016;351:391–6. doi:10.1126/science.aad6780.

[34] Ni MJ, Hu ZH, Liu Q, Liu MF, Lu MH, Zhang JS, *et al*. Identification and characterization of a novel non-coding rna involved in sperm maturation. PLoS One 2011;6:e26053. doi:10.1371/journal.pone.0026053.

[35] Boerke A, Dieleman SJ, Gadella BM. A possible role for sperm RNA in early embryo development. Theriogenology 2007;68 Suppl 1:S147-55. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.058.

[36] Benito E, Kerimoglu C, Ramachandran B, Pena-Centeno T, Jain G, Stilling RM, *et al*. RNA-Dependent Intergenerational Inheritance of Enhanced Synaptic Plasticity after Environmental Enrichment. Cell Rep 2018;23:546–54. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.059.

[37] Chan JC, Morgan CP, Adrian Leu N, Shetty A, Cisse YM, Nugent BM, *et al*. Reproductive tract extracellular vesicles are sufficient to transmit intergenerational stress and program neurodevelopment. Nat Commun 2020;11:1–13. doi:10.1038/s41467-020- 15305-w.

[38] Alves MBR, Arruda RP de, Batissaco L, Garcia-Oliveros LN, Gonzaga VHG, Nogueira VJM, *et al*. Changes in miRNA levels of sperm and small extracellular vesicles of seminal plasma are associated with transient scrotal heat stress in bulls. Theriogenology 2021;161:26–40. doi:10.1016/j.theriogenology.2020.11.015.

[39] Alves MBR, Arruda RP, De Bem THC, Florez-Rodriguez SA, Sá Filho MF, Belleannée C, *et al*. Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. Sci Rep 2019;9. doi:10.1038/s41598-019-46775-8.

[40] Fagerlind M, Stalhammar H, Olsson B, Klinga-Levan K. Expression of miRNAs in Bull Spermatozoa Correlates with Fertility Rates. Reprod Domest Anim 2015;50:587–94. doi:10.1111/rda.12531.

[41] Robaire B, Hinton BT. The Epididymis. vol. 1. Fourth Edi. Elsevier; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00017-X.

[42] Sullivan R, Saez F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: Their roles in mammalian male reproductive physiology. Reproduction 2013;146. doi:10.1530/REP-13- 0058.

[43] Saez F, Frenette G. Epididymosomes and Prostasomes : Their Roles in Posttesticular Maturation of the Sperm Cells Minireview. J Androl 2003;24:149–54.

[44] Fereshteh Z, Schmidt SA, Al-Dossary AA, Accerbi M, Arighi C, Cowart J, *et al*. Murine Oviductosomes (OVS) microRNA profiling during the estrous cycle: Delivery of OVS- borne microRNAs to sperm where miR-34c-5p localizes at the centrosome. Sci Rep 2018;8:16094. doi:10.1038/s41598-018-34409-4.

[45] Domeniconi RF., Souza ACF., Xu B., Washington A m. ., Hinton BT. Is the epididymis a series of organs placed side by side? Biol Reprod 2016;95:1–8. doi:10.1095/biolreprod.116.138768.

[46] Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. Blood Cells, Mol Dis 2005;35:1–10. doi:10.1016/j.bcmd.2005.03.005.

[47] Sullivan R. Epididymosomes: A heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. Asian J Androl 2015;17:726–9. doi:10.4103/1008-682X.155255.

[48] Nixon B, De Iuliis GN, Hart HM, Zhou W, Mathe A, Bernstein IR, *et al*. Proteomic Profiling of Mouse Epididymosomes Reveals their Contributions to Post-testicular Sperm Maturation. Mol Cell Proteomics 2019;18:S91–108. doi:10.1074/mcp.RA118.000946.

[49] Frenette G, Sullivan R. Prostasome-like particles are involved in the transfer of P25b from the bovine epididymal fluid to the sperm surface. Mol Reprod Dev 2001;59:115–21. doi:10.1002/mrd.1013.

[50] Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, *et al*. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. Sci Rep 2016;6:1–15. doi:10.1038/srep31794.

[51] Sharma U, Sun F, Conine CC, Herzog VA, Ameres SL, Rando OJ, *et al*. Small RNAs are trafficked from the epididymis to developing mammalian sperm. Dev Cell 2018;46:1–14. doi:10.1016/j.devcel.2018.06.023.

[52] Conine CC, Sun F, Song L, Rivera-Pérez JA, Rando OJ. Small RNAs gained during epididymal transit of sperm are essential for embryonic development in mice. Dev Cell 2018;46:470-480.e3. doi:10.1016/j.devcel.2018.06.024.

[53] Capra E, Turri F, Lazzari B, Cremonesi P, Gliozzi TM, Fojadelli I, *et al*. Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations. BMC Genomics 2017;18:14. doi:10.1186/s12864-016-3394-7.

[54] Baker MA, Hetherington L, Weinberg A, Naumovski N, Velkov T, Pelzing M, *et al*. Analysis of phosphopeptide changes as spermatozoa acquire functional competence in the epididymis demonstrates changes in the post-translational modification of izumo1. J Proteome Res 2012;11:5252–64. doi:10.1021/pr300468m.

[55] Austin CR, Bishop MWH. Capacitation of mammalian spermatozoa. Nature 1958;1:851.

[56] Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature 1951;168:697–698.

[57] Signorelli J, Diaz ES, Morales P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. Cell Tissue Res 2012. doi:10.1007/s00441-012-1370-3.

[58] Breitbart H, Rotman T, Rubinstein S, Etkovitz N. Role and regulation of PI3K in sperm capacitation and the acrosome reaction. Mol Cell Endocrinol 2010;314:234–8. doi:10.1016/j.mce.2009.06.009.

[59] Osaki LH, Gama P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation. Int J Mol Sci 2013;14:10143–61. doi:10.3390/ijms140510143.

[60] Li Y, Li RH, Ran MX, Zhang Y, Liang K, Ren YN, *et al*. High throughput small RNA and transcriptome sequencing reveal capacitation-related microRNAs and mRNA in boar sperm. BMC Genomics 2018;19:1–12. doi:10.1186/s12864-018-5132-9.

[61] Chávez JC, de la Vega-Beltrán JL, Escoffier J, Visconti PE, Treviño CL, Darszon A, *et al*. Ion Permeabilities in Mouse Sperm Reveal an External Trigger for SLO3-Dependent Hyperpolarization. PLoS One 2013;8:1–13. doi:10.1371/journal.pone.0060578.

[62] Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, *et al*. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca 2 + oscillations in eggs and embryo development. Development 2002;3544:3533–44.

[63] Schatten H, Sun Q-Y. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. Mol Hum Reprod 2009;15:531–8. doi:10.1093/molehr/gap049.

[64] Simerly C, Wu G-J, Zoran S, Ord T, Rawlins R, Jones J, *et al*. The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. Nat Med 1995;1:47–52.

[65] Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature 1991;352:255–7. doi:10.1038/352255a0.

[66] Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, *et al*. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. Proc Natl Acad Sci 2018;115:13039–44. doi:10.1073/pnas.1810946115.

[67] Wang M, Gao Y, Qu P, Qing S, Qiao F, Zhang Y, *et al*. Sperm-borne miR-449b influences cleavage, epigenetic reprogramming and apoptosis of SCNT embryos in bovine. Sci Rep 2017;7:1–12. doi:10.1038/s41598-017-13899-8.

[68] Xu H, Wang X, Wang Z, Li J, Xu Z, Miao M, *et al*. MicroRNA expression profile analysis in sperm reveals hsa-mir-191 as an auspicious omen of *in vitro* fertilization. BMC Genomics 2020;21:165. doi:10.1186/s12864-020-6570-8.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processos nº 2015/09154-6; 2016/05395-1; e 2019/23685-5) e ao CNPq (Processo nº 306291/2017-7) pelo auxílio financeiro na realização dos trabalhos do grupo de pesquisa relacionados ao tema abordado nesta revisão.

Avaliação computadorizada do sêmen: o que o laudo diz?

Márcio Menezes Nunes
mmnunes@minitube.com.br
Minitub do Brasil Ltda
Departamento de Veterinária – UFV

Abstract: Nowadays the use of a computer semen analysis became more popular and often used as a tool to predict sample fertility. However, this automatic way of semen evaluation is not protected from external influences or modifications. Samples approved and labelled as having enough motile sperm can be totally different following the systems parameters used. To compare motility semen reports coming from different sources is difficult due customized setups used to select sperm cells as motile, fast or other denominations, causing an imprecise comparison among CASA systems and a still more inaccurate prediction of fertility. The CASA report reflects the system setup itself and not necessarily the real sample motility or fertility potential. Even knowing the huge influence of previous steps, if considering only the system results a more realistic comparison among reports could be reached using the original means of velocities and their interactions as VSL, VAP, VCL, LIN and others.

Keywords: CASA System, Sperm evaluation, motility report.

Palavras-chave: Sistema CASA, Avaliação espermática, Motilidade.

Introdução

Nas avaliações espermáticas em centrais de manipulação de sêmen, pesquisas científicas ou na rotina da reprodução assistida, em última análise, se busca a predição da fertilidade de amostras. Neste cenário, a avaliação computadorizada da motilidade emergiu como uma inovação sem influências subjetivas, de resposta rápida, uso simplificado e cada vez mais acessível. No entanto, esta tecnologia tem assumido uma responsabilidade inadequada quando uma visão crítica não acompanha o resultado do exame computadorizado, seja em sua própria interpretação ou quando há buscas pela comparação entre avaliações de amostras realizadas em diferentes sistemas e protocolos.

Avaliação computadorizada – Mais dúvidas do que certezas

Fora do universo acadêmico, onde se pressupõe uma interpretação cautelosa dos laudos, o fácil acesso à avaliação computadorizada gera grandes desacordos entre resultados de amostras obtidos sob uma inverídica alegação de padronização. Progressivamente essa tecnologia se torna mais acessível, com exigências simplificadas de sistemas óticos e softwares gratuitos, muitos disponíveis online com fácil manuseio pelo usuário, gerando uma falsa e

imprudente credibilidade no campo quando doses, buscando agregar valores, vêm acompanhadas de questionáveis avaliações em sistemas "CASA" (Computer Assisted Spem Analysis).

Sistemas computadorizados podem avaliar alguns compartimentos celulares, o metabolismo e o material genético mediante a utilização de sondas e filtros apropriados, mas suas aplicações mais habituais são para a mensuração da concentração espermática e a caracterização do deslocamento celular. Para estas duas últimas aplicações, diversas influências podem atuar modificando a leitura do sistema, pontos fundamentais que muitos usuários desconhecem e que não são explicitados em laudos ou mesmo em muitas publicações científicas.

Ao contrário do praticado em condições reais de campo e mercado, a avaliação isolada de motilidade espermática, sem outras análises da amostra, não representa uma inquestionável prova de qualidade. A automatização confere uma desejável repetibilidade de avaliações, mas quanto à fertilidade, a motilidade possui maior correlação quando está baixa do que quando elevada, mas ainda assim altos percentuais de motilidade podem demonstrar características deletérias do espermatozoide.

A motilidade espermática

Muito da associação entre motilidade e fertilidade advém da real correlação entre o deslocamento espermático e diversos aspectos do metabolismo celular. No entanto, além do percentual e do padrão desta movimentação espermática outros parâmetros devem ser considerados quando se busca maior assertividade quanto ao potencial fértil da amostra.

A análise computadorizada, apesar de algumas décadas de utilização, ainda sofre com vícios oriundos da avaliação subjetiva, principalmente na nomenclatura. A classificação da motilidade como progressiva, motilidade local, espermatozoides rápidos, lentos e demais rótulos empregados são uma busca de tradução desta nova linguagem de movimento em compreensões já sólidas entre os técnicos. No entanto, enquanto antes se entendia que aquela avaliação de móveis significava alguém treinado observando deslocamento de células em um método padrão de grande consenso, o laudo automatizado não necessariamente segue este mesmo critério na classificação apesar de utilizar a mesma denominação.

A identificação de cada uma das células é o ponto de partida da avaliação computadorizada, necessitando para tal uma concentração máxima na amostra e uma qualidade de imagem que permita também o acompanhamento da trajetória espermática durante o máximo tempo ideal de leitura. Neste percurso o deslocamento da célula permite mensurações objetivas seguindo a adequada calibração do equipamento, estabelecendo medidas que consideram distância (micrômetros) versus tempo (segundos). Estas informações do deslocamento e as interações destas compõem um pool de mensurações de cada célula: a velocidade curvilinear (VCL), a velocidade média do trajeto (VAP), a velocidade em linha reta (VSL), a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), o raio da curva descrita (RADIUS), a frequência de movimentação celular (BCF), além de combinações como linearidade (LIN=VSL/VCL; %), por exemplo.

Visto isso, na tentativa de traduzir "motilidade progressiva" com estas mensurações, diversas combinações são utilizadas em diferentes programas, gerando conclusões de mesma

denominação para valores muito diferentes, não havendo uma padronização e tornando ainda mais imprecisa a inferência de fertilidade com base na motilidade.

Os esforços para uma conscientização da necessária padronização de parâmetros avaliados perdem em muito para a proliferação de opções de sistemas. Há uma demanda crescente apostando na ilusão de confiabilidade das avaliações unicamente por se tratarem de computadores realizando o procedimento, porém há vários pontos que influenciam no laudo e, consequentemente, comprometem sua credibilidade e inviabilizam ainda mais a comparação entre resultados obtidos em diferentes origens.

Alguns fatores que interferem na avaliação computadorizada:

A captação da imagem

Todo o sistema é baseado em avaliação de imagens e, assim como ocorre nas rotinas dos laboratórios de processamento de sêmen, a qualidade ótica influencia muito na precisão. Desta forma, apesar de muitos modernos recursos incluídos nos softwares para o processamento de imagens, um conjunto superior de lentes e câmeras conferirá maior assertividade nos diagnósticos.

Software e Hardware

A velocidade na obtenção do resultado é uma exigência comum dos usuários de sistemas automatizados. Ao mesmo tempo, imagens de melhor qualidade possuem arquivos maiores e demandam mais qualidade e tempo do sistema para seu processamento, algo que deveria levar todos à suspeição de perda da precisão em prol de uma maior velocidade de resposta quando se utiliza um equipamento demasiadamente simples.

Captura de vídeos

Não apenas a qualidade importa, mas também o número de frames capturados, pois isso implicará em uma melhor avaliação da movimentação celular em todo o percurso. Vídeos curtos são mais rapidamente processados, porém alteram os valores obtidos na trajetória de cada célula.

A temperatura da amostra

Microscópios com precisos sistemas de aquecimento são imprescindíveis para uma boa avaliação, mantendo a amostra em condições ideais durante a captura de imagens, principalmente quando se utiliza sistemas mais lentos com mudanças de campos realizadas manualmente. Nestes casos, sem uma manutenção da temperatura, os parâmetros da mesma amostra podem variar entre o primeiro campo e o último, fornecendo uma média errônea da motilidade espermática.

A concentração da amostra

A precisão da avaliação computadorizada depende da individualização dos limites de cada célula durante toda a sua movimentação. Desta forma, uma concentração elevada compromete a identificação das células, comprometendo o cálculo da concentração total e, consequentemente, o resultado do percentual de motilidade. Nestes casos, as colisões entre espermatozoides comprometem sobremaneira a precisa identificação individualizada do percurso das células, gerando resultados irreais.

Em sistemas incapazes de diferenciar células espermáticas pelo seu formato, se baseando apenas na área do objeto, diluentes com muitas partículas comprometem todos os parâmetros por superestimarem o número total de células.

A viscosidade da amostra

Como exemplo, é de amplo conhecimento que a concentração de gema de ovo influencia na viscosidade da amostra e, consequentemente, na velocidade de movimento. Por esta razão, ao se comparar duas amostras diferentes avaliadas no mesmo sistema a diferença nos resultados pode refletir apenas esta característica do meio diluidor e não uma maior ou menor fertilidade como muitas vezes se busca inferir.

O intervalo desde o descongelamento até a avaliação

Diversas alterações osmóticas, estruturais e metabólicas ocorrem na célula espermática após o descongelamento, mas uma falta de padronização existe sobre qual o intervalo ideal até a estabilização destas alterações para a precisa avaliação. Afinal, para ilustrar, um intervalo curto demais poderá, dependendo do diluente utilizado, fornecer uma leitura de baixa motilidade ou até mesmo uma hipermotilidade. Ao mesmo tempo, um intervalo muito longo, dependendo da concentração da amostra e do tamponamento do diluente em questão, poderá incorrer em uma reprovação incorreta da amostra.

A espécie e o indivíduo

A espécie equina é um bom exemplo de movimentação celular potencialmente reprovável se um protocolo padrão for utilizado, pois a inserção abaxial da cauda confere uma trajetória circular indesejada para outras espécies. Independente disso, é de conhecimento dos técnicos, que há animais com características seminais mais circulares que outros ou mais lentos que muitos sem implicações na fertilidade, mas que seriam classificados negativamente se consideradas apenas as características de movimento espermático.

Considerações finais

Por todas estas observações pontuadas, além das imprescindíveis avaliações complementares de elevada correlação com a fertilidade, tal como a morfologia espermática, é crucial a avaliação criteriosa do laudo computadorizado. Em sistemas que possuem os parâme-

tros abertos e permitem a customização dos perfis, muito pode ser modificado alterando o resultado e impossibilitando comparações. Com um maior critério, a comparação entre resultados só é possível se for realizada entre duas ou mais amostras avaliadas em um mesmo sistema seguindo o mesmo protocolo, considerando os componentes da movimentação espermática expressos em micrômetros/segundo e seguindo um padrão de velocidade previamente estabelecido.

A comparação entre laudos com classificações oriundas da denominação subjetiva é muito inadequada, pois uma amostra aprovada por apresentar motilidade progressiva acima de 30% em um sistema pode ser avaliada de modo muito diferente em um outro que utilize parâmetros distintos, sem mencionar minúcias de protocolos e demais influências já destacadas.

Referências bibliográficas

Amann, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology* 1989; 10:89-98.

Amann, R. P. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology* 2005; 63:698-715.

Arruda, R. P.; Andrade, A. F. C.; Peres, K. R.; Raphael, C. F.; Nascimento, J.; Celeghini, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*; 31:8-16.

Battut, I. B.; Kempfer, A.; Lemasson, N.; Chevrier, L.; Camugli, S. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology* 2017; 97:186-200.

Buss, T.; Aurich, J.; Aurich, C. Evaluation of a portable device for assessment of motility in stallion semen. *Reproduction in Domestic Animals* 2018; 00:1-6.

Griffin, R. A.; Baker, M.; Aitken, R. J.; Swegen, A.; Gibb, Z. What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction* 2019; 158:125-137.

Katila T. *In vitro* evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Veterinary Scandinavia* 2001; 42:199-217.

Quintero-Moreno, A.; Miró, J.; Rigau, A. T.; Rodríguez-Gil, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59:1973-1990.

Whitesell, K.; Stefanovski, D.; McDonnell, S.; Turner, R. Evaluation of effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions. *Theriogenology* 2020; 142:67-76.

Bull Sperm Zinc Ion Flux as a Marker for the Acquisition of Fertilization Competency

Karl Kerns
kkerns@iastate.edu
Iowa State University, Department of Animal Science
University of Missouri, Division of Animal Sciences
Peter Sutovsky
University of Missouri, Division of Animal Sciences
University of Missouri, Department of Obstetrics, Gynecology and Women's Health

Abstract: Previously we reported on zinc localization patterns, as detected by zinc reporter FluoZin 3 AM, in bull, boar, and man. This zinc localization pattern was termed the sperm zinc signature. This sperm zinc signature corresponds with major events on the pathway to fertilization competency, including major physiologically relevant events during sperm capacitation. Here we briefly describe this zinc signature and elucidate previous findings as it relates to the bull. The bull sperm zinc signature is indicative of important bull sperm capacitation events, necessary for sperm progression to a fertilization competent state. These findings represent a shift in the understanding of bull fertilization competency, paving the way for improved bull fertility diagnostics and artificial insemination as well as a diagnostic tool for developing new bull semen cryopreservation methods.

Keywords: biomarker; fertility; sperm capacitation.

Palavras-chave: biomarcardor; capacitação espermática; fertilidade.

Introduction

The highest concentrations of zinc (Zn) found in bodily fluids is found in seminal fluids, reportedly containing 1.6-3.6 mM zinc ions (Zn^{2+}) [1]. It is known that male infertility stemming from the accidental Chernobyl radiation in Ukraine was associated with decreased human seminal fluid zinc content [2]. Likewise, it is known that men with low or nonmotile spermatozoa have decreased zinc ions in their seminal fluid [3] while fertile men have increased seminal fluid zinc levels compared to infertile men [4, 5]. These relationships, among others, led us to inquire about zinc signaling pathways in sperm at the cellular level and whether or not zinc localization was present. We previously reported zinc localization in bull, boar, and man [6] using epifluorescent microscopy and image-based flow cytometry (IBFC). In these studies, we described zinc fluxes were associated with key points leading up to sperm fertilization competency. This includes hyperactivated motility [6], the capability to bind glycans of the porcine sperm oviduct reservoir [7], remodeling of the plasma membrane, remodeling and acrosome exocytosis [6], and regulating zona pellucida proteinase MMP2

[7]. For further details regarding sperm zinc pathways and it's necessary involvement in sperm fertilization competency, see our recent review [8].

Methods

Semen processing

Cryopreserved *Bos taurus* spermatozoa were thawed for 45 seconds in a 35 °C water bath then immediately placed into a 15 mL conical tube with 5 mL of TL-HEPES as previously reported [8]. The spermatozoa were then centrifuged in a swing hinge rotor centrifuge at 110×g for 5 minutes. The number of washes and g- force used were minimized as these were found to compromise results. Sperm concentration was then determined using a hemocytometer.

In vitro capacitation

Bull spermatozoa went through a bovine modified *in vitro* capacitation (IVC) assay as previously reported [8]. First noncapacitating media (NCM) was made containing 100 mM NaCl, 0.3 mM NaH2PO4, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl2, 1 mM sodium pyruvate, 22 mM sodium lactate, 40 mM HEPES, 21 mM gentamycin, and 0.174 mM penicillin G and brought to 7.20 pH. This media was then used to create bovine capacitation media (bCM) containing 2.1 mM CaCl2, 2 mM NaHCO3, 0.01 mM PVA, 10 µg/mL heparin, and 0.6% (m/v) bovine serum albumin (BSA), adjusted to 7.40 pH. This medium hyperactivates spermatozoa, induces protein tyrosine phosphorylation, and renders sperm capable of recognizing and binding to the zona pellucida, undergoing acrosomal exocytosis and penetrating the oocyte zona pellucida [9]. After semen was thawed and initially washed, a portion of spermatozoa were centrifuged one more time and resuspended with bovine capacitation media and incubated in a 37 °C water bath for 6 hours, with eppendorf tube rotation performed every 60 minutes. All reagents were purchased from Sigma unless otherwise noted.

Multiplex fluorescence probing

Upon 6 hours of IVC, 100 µL volume (4 million spermatozoa) of spermatozoa were incubated 30 minutes with 1:500 FZ3 (FluoZin™ 3 AM), 1:2000 lectin PNA Alexa Fluor 647 (PNA-AF647), 1:1000 Hoechst 33342 (H33342), and 1:1000 propidium iodide (PI). Spermatozoa were then washed of probes once and resuspended in NCM to allow complete de-esterification of intracellular AM esters, followed by an additional wash and resuspended in 100µL PBS for IBFC.

Image-based flow cytometric data acquisition

IBFC data acquisition was performed as previously described [6]. Specifically, using a FlowSight flow cytometer (FS) fitted with a ×20 microscope objective (numerical aperture of 0.9) with an imaging rate up to 2000 events/second. The sheath fluid was PBS (without

calcium or magnesium). The flow-core diameter was 10 µm set to a speed of 66 mm/second. Raw image data were acquired using INSPIRE® software. In INSPIRE® FS data acquisition software, two bright-field channels were collected (channels 1 and 9), one FZ3 image (channel 2), one PI image (channel 5), one side scatter (SSC; channel 6), one H33342 (channel 7), and one PNA-647 image (channel 11), with a minimum of 10,000 spermatozoa collected. The following lasers and power settings were used: 405 nm (to excite H33342): 10 mW; 488 nm (to excite FZ3): 60 mW; 561 nm (to excite PI): 40 mW, 642 nm (to excite PNA-647): 25 mW; and 785 nM SSC laser: 10 mW.

IBFC data analysis

Data were analyzed using IDEAS® analysis software version 6.2 from AMNIS EMD Millipore. Gating approach used standard focus and single cell gating calculations created by IDEAS software as previouslydescribed [6].

Results

Using zinc reporter FluoZin-3 AM (FZ3) paired with image-based flow cytometry (IBFC), we show the four originally discovered sperm zinc signatures [6] and newly reported sperm acrosome localization [7] in **Figure 1**. Specifically, zinc signature 1 has zinc localization reported by FZ3 fluorescence across the entire sperm head and sperm tail, including the principal and end pieces (**Figure 1a**). Zinc localization to only the sperm head and midpiece, excluding principal and end pieces is signature 2 (**Figure 1b**). Acrosome region zinc localization tends to be associated with midpiece localization, currently being termed signature 3+5 (**Figure 1c**). Zinc localization to the sperm midpiece alone is that of signature 3 (**Figure 1d**) and no zinc localization (as reported by FZ3) is that of signature 4 (**Figure 1e**).

Scatter plots displaying intensity of FZ3, plasma membrane integrity reflecting DNA stain propidium iodide (PI), and acrosome integrity reflecting lectin PNA-AF647, establish multiple sperm subpopulations exist after thawing of cryopreserved bull sperm (**Figure 2**; gray points). The portion of sperm in each of these subpopulations change after 6 hours of *in vitro* capacitation (**Figure 2**; green points).

Figure 1. Sperm zinc signatures of bull spermatozoa. **A**, Signature 1 with zinc localization to the entire sperm head and sperm tail, including the principal and end pieces. **B**, Signature 2 with zinc localization to the sperm head and sperm midpiece. **C**, Signature 3+5 is newly identified with acrosome zinc labeling associated with sperm midpiece localization. **D**, Signature 3 with zinc localization to the sperm midpiece only. **E**, Signature 4, with no zinc localization reported by the FZ3 probe.

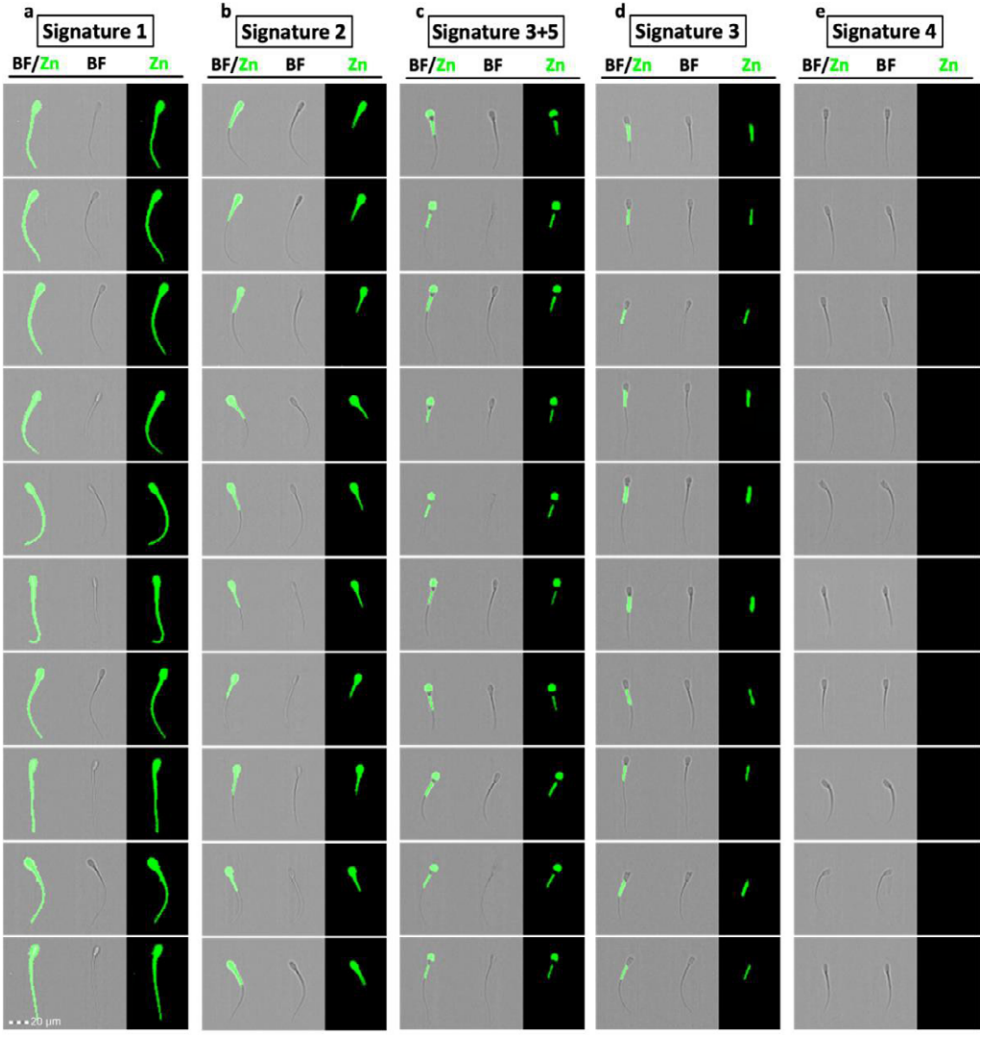
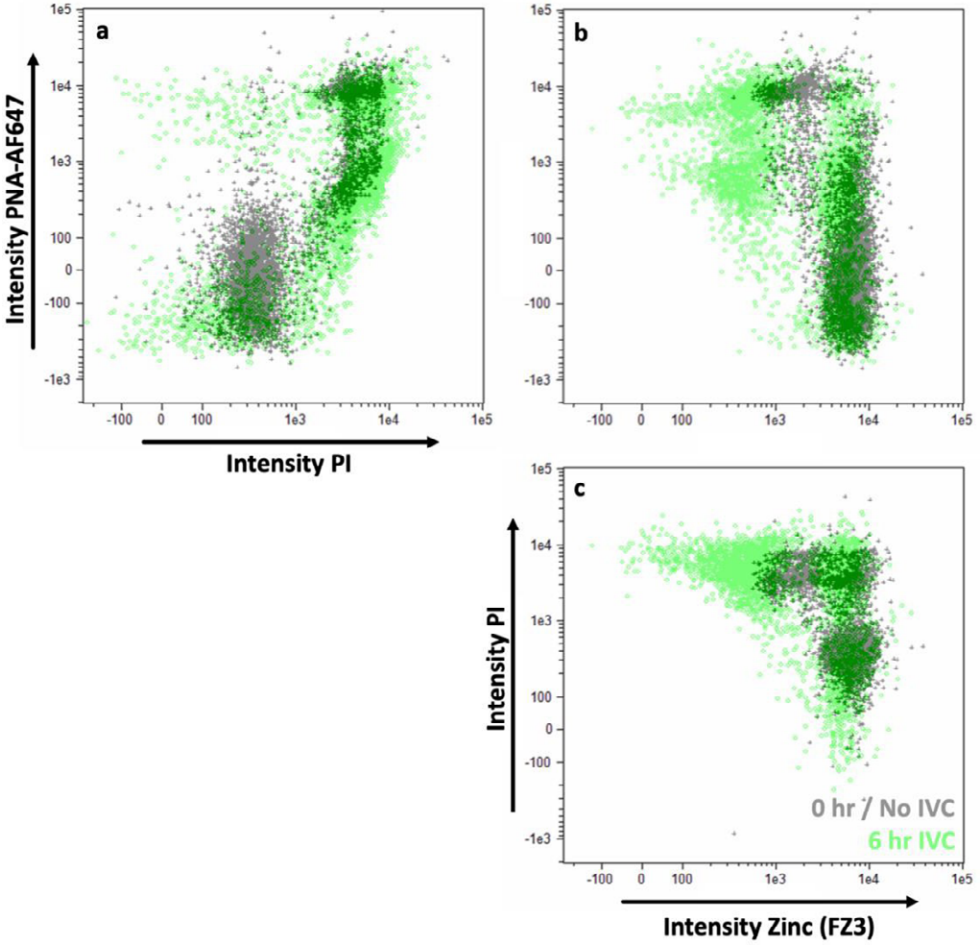


Figure 2. Scatter plot examples of bull sperm sub-populations before (gray) and after 6 hours of *in vitro* capacitation (green). Each dot represents a single sperm. Dark green spots are portions where sperm subpopulations exist in both 0- and 6-hour samples. **A**, Plasa membrane integrity reflecting DNA stain propidium iodide (PI) intensity along the x-axis with acrosome integrity reflecting lectin PNA-AF647 intensity along the y-axis. **B**, Zinc reporter FluoZin-3 AM (FZ3) intensity along the x-axis with lectin PNA-AF647 intensity along the y-axis. **C**, FZ3 intensity along the x-axis with PI intensity along the y-axis.



Discussion

We previously reported in detail on the sperm capacitation state of sperm zinc signatures 1-4 [6] and recently regarding the existence of acrosome labeling [7]. Cryopreserved bull sperm have little (as percent of entire population) sperm in a zinc Signature 1 state. This is

likely due to cryoprotectants or the freeze/thaw process, though the zinc signature of fresh bull sperm has not been analyzed. Zinc signature 1 sperm in the current trial seemed to have higher incidences of tail abnormalities (**Figure 1a**), likely reflecting their inability to progress through sperm capacitation. During current trials, sperm zinc acrosome localization is associated with midpiece zinc localization, termed here as Signature 3+5 (**Figure 1c**). In the nine bulls screened, no abundant spermatozoa subpopulations were identified with zinc acrosome labeling without the midpiece localization. Future bull sperm zinc signature evaluation should assess if some bulls have zinc localization to only the acrosome, without midpiece localization. It appears the zinc acrosome localization appears mostly after or during *in vitro* capacitation. Zinc localization to the sperm acrosome likely represents Zn-sensing receptor GPR39, a G-protein-coupled receptor localized to bull sperm acrosomes. Previous reports believe GPR39 might regulate acrosome exocytosis [10].

Scatter plots in **Figure 2** illustrate the relationship between sperm cell reported fluorescent intensities of zinc (FZ3), acrosome integrity (PNA-AF647), and plasma membrane integrity (PI). We previously reported sperm with zinc signature 1 and 2 states have intact acrosomes and plasma membranes, with remodeling to each of these done in the later zinc signature 3 and 4 states [6]. Discovery of the new acrosome zinc localization associated with midpiece zinc localization (Signature 3+5) have a mixture of intact and remodeled acrosomes and plasma membranes. Future studies should elucidate this relationship with the ability to detect and bind the oocyte zona pellucida and other physiologically relevant points in sperm capacitation.

Conclusion

The sperm zinc signature is a new, physiologically relevant marker of bull sperm fertilization competency, correlating with key biological events during sperm capacitation. Here we show an *in vitro* capacitation assay can help reveal spermatozoa capable of undergoing sperm capacitation. These findings represent a shift in the understanding of bull fertilization competency, paving the way for improved bull fertility diagnostics and artificial insemination.

References

[1] Massanyi, P.; Trandzik, J.; Nad, P.; Korenekova, B.; Skalicka, M.; Toman, R. *et al.* Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in boar semen and relation to the spermatozoa quality. *Journal of environmental science and health* Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering. 2003;38:2643-51.

[2] Andreychenko, S. V.; Klepko, A. V.; Gorban, L. V.; Motryna, O. A.; Grubska, L. V.; Trofimenko, O. V. Post-Chornobyl remote radiation effects on human sperm and seminal plasma characteristics. *Experimental oncology.* 2016;38:245-51.

[3] Nenkova, G.; Petrov, L.; Alexandrova, A. Role of Trace Elements for Oxidative Status and Quality of Human Sperm. *Balkan medical journal.* 2017.

[4] Colagar, A. H.; Marzony, E. T.; Chaichi, M. J. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition research* (New York, NY). 2009;29:82-8.

[5] Zhao, J.; Dong, X.; Hu, X.; Long, Z.; Wang, L.; Liu, Q. *et al.* Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6.

[6] Kerns, K.; Zigo, M.; Drobnis, E. Z.; Sutovsky, M.; Sutovsky, P. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. *Nature Communications*. 2018;9:2061.

[7] Kerns, K.; Sharif, M.; Zigo, M.; Xu, W.; Hamilton, L. E.; Sutovsky, M. *et al*. Sperm Cohort-Specific Zinc Signature Acquisition and Capacitation-Induced Zinc Flux Regulate Sperm-Oviduct and Sperm-Zona Pellucida Interactions. *Int J Mol Sci*. 2020;21.

[8] Kerns, K.; Zigo, M.; Sutovsky, P. Zinc: A Necessary Ion for Mammalian Sperm Fertilization Competency. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19:4097.

[9] Zimmerman, S. W.; Manandhar, G.; Yi, Y. J.; Gupta, S. K.; Sutovsky, M.; Odhiambo, J. F. *et al*. Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization. *PloS one*. 2011;6:e17256.

[10] Michailov, Y.; Ickowicz, D.; Breitbart, H. Zn2+-stimulation of sperm capacitation and of the acrosome reaction is mediated by EGFR activation. *Dev Biol*. 2014;396:246-55.

Acknowledgments: Supported by the National Institute of Food and Agriculture (NIFA), U.S. Department of Agriculture (USDA) Postgraduate Fellowship award number 2019-67012-34005 (K.K.), USDA NIFA grant number 2015-67015-23231 (P.S.), grant number 5 R01 HD084353-02 from NIH National Institute of Child and Human Development (P.S.), and seed funding from the Food for the 21st Century Program of the University of Missouri (P.S.).

Aspectos reprodutivos e biotecnologias da reprodução de peixes

Carminda Sandra Brito Salmito-Vanderley
sandra.salmito@uece.br

Thais Maia Torres

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução de Peixes,
Núcleo Integrado de Biotecnologia, Universidade Estadual do Ceará

Abstract: Because of the growth in the aquaculture industry and the social demand for fish, fish reproductive biotechnologies have grown, especially regarding the preservation of gametes and embryos. Among these reproductive biotechnologies, seminal conservation, such as cooling and freezing, stands out. Cooling maintains sperm viability, reducing metabolic activity and spontaneous activation, for a short period of time. Seminal freezing is a technology that allows seminal storage for an unlimited period. However, it is first important to know the reproductive characteristics of males, such as aspects related to their maturity, semen, sperm cells and the influence of environmental factors on their reproduction. In this work, information was gathered about the main reproductive aspects of fish and reproductive biotechnologies developed in the conservation of their genetic material.

Keywords: cooling; freezing; teleosts.

Palavras-chave: congelação; resfriamento; teleósteos.

Introdução

Tanto o estudo de aspectos reprodutivos quanto o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas se iniciaram com espécies de mamíferos, e, dessa forma, encontram-se mais avançados nesse grupo animal. Entretanto, o aumento da produção de peixes pela aquicultura e consequente estagnação da pesca extrativa [1], juntamente com a necessidade de preservar espécies ameaçadas em seu ambiente natural, fez com que o estudo reprodutivo de peixes e sua aplicação na biotecnologia ganhasse força. Impulsionada por esse crescimento da indústria aquícola, pela exigência social por pescados e pelo apelo ambiental, as biotecnologias reprodutivas de peixes têm se destacado principalmente em relação a preservação de gametas e embriões [2].

Dentre essas biotecnologias reprodutivas, destacam-se as de conservação seminal. Uma importante razão para que se dê preferência ao uso do gameta masculino, é o aporte genético dos machos e a possibilidade de se aplicar uma pressão de seleção maior e mais rápida nesses animais, fazendo com que contribuam mais com a eficiência reprodutiva [3]. Além disso, destaca-se a maior facilidade de manipulação do sêmen em comparação com a de ovócitos e embriões. Dessa forma, primeiramente é importante conhecer as características reprodutivas

dos machos como aspectos relacionados à sua maturidade, ao sêmen, às células espermáticas e à influência de fatores ambientais na sua reprodução.

A conservação seminal é realizada geralmente de duas formas: resfriamento e congelação, existindo ainda o processo de vitrificação. O resfriamento mantém a viabilidade espermática, reduzindo a atividade metabólica e a ativação espontânea, por um breve período de tempo, enquanto a congelação e a vitrificação seminal são biotecnologias que permitem o armazenamento seminal por tempo indefinido [4].

Tendo em vista a crescente relevância desse tema, esse trabalho reuniu informações acerca dos principais aspectos reprodutivos de peixes e das biotecnologias reprodutivas desenvolvidas na conservação de seu material genético.

Aspectos reprodutivos de peixes

Cerca de 96% das espécies de peixe do mundo estão classificadas como teleósteos e, desta porcentagem, uma parte desproporcional está presente nos ambientes dulcícolas, visto que estes ecossistemas representam uma pequena parte da água do planeta [5]. Conhecer os principais aspectos reprodutivos desses animais é importante para sua conservação e criação em cativeiro, bem como para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas que possibilitem sua reprodução assistida. Em relação aos vertebrados, os teleósteos são os que mais possuem variações de formas e padrões de ciclo de vida, sendo capazes de obter sucesso nos mais diversos ambientes [5].

Maturidade sexual

Essa variedade pode ser observada em diversos aspectos reprodutivos dos peixes, como a idade ou tamanho de primeira maturação gonadal, que difere bruscamente entre espécies [6]. Enquanto algumas espécies de peixe começam a desovar com apenas alguns meses, outras podem demorar anos. A mesma espécie pode ter ainda variação na idade de maturação sexual, a depender do ambiente em que se encontra, como pode ser observado em espécimes habitantes de clima tropical, maturando anos mais cedo que um exemplar de sua mesma espécie em clima temperado [6].

Apesar de muitas espécies de peixe não apresentarem dimorfismo sexual, ao atingirem a maturidade e estarem aptas a reprodução, algumas características externas podem ser observadas nesses animais. Ambos os sexos podem apresentar a papila urogenital hiperêmica, e sob leve pressão abdominal os machos liberam sêmen enquanto as fêmeas, normalmente abauladas, liberam ova. A seleção de machos pode ser facilitada em algumas espécies que emitem roncos ou que desenvolvem espículas na nadadeira anal durante o período reprodutivo, ou ainda em casos em que as fêmeas são maiores que os machos [7].

Em peixes sem dimorfismo sexual, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), além da observação das características externas, algumas técnicas como a canulação urogenital e a observação dos níveis de esteroides no sangue podem ser empregadas para a determinação do sexo e do estágio de maturação desses animais [7]. Entretanto, por serem considerados

métodos invasivos e que podem prejudicar a saúde e o bem-estar animal, mais recentemente a ultrassonografia surgiu como uma ferramenta útil para a realização dessas funções. Em um trabalho recente, que avaliou a ultrassonografia como ferramenta na análise gonadal de curimatã comum (*Prochilodus brevis*), foi possível observar que esse é um método realmente efetivo e não invasivo, porém possui uma maior eficácia quando realizado dentro do período reprodutivo da espécie [8].

Tipos de fertilização

As estratégias reprodutivas entre os teleósteos são extremamente diversas. Em relação ao modo de fertilização, os teleósteos podem apresentar fertilização interna ou externa. Na interna, os ovócitos são fertilizados dentro do corpo da fêmea e, para isso, normalmente os machos apresentam caracteres sexuais secundários, como modificações da nadadeira anal em um gonopódio que atuará como órgão copulador [5], como ocorre na espécie *Poecilia vivipara* [9]. Os embriões gerados no interior da fêmea podem ser mantidos exclusivamente pelo vitelo presente no ovo, ou ainda podem ser mantidos parcialmente por nutrientes adquiridos do corpo da fêmea [10].

Apesar da existência de espécies de peixes teleósteos com fertilização interna, a maioria, mais de 90% das espécies, apresenta fertilização externa [11]. Nesse caso, ovócitos e espermatozoides são liberados na água para que a fertilização ocorra no ambiente aquoso. Nesses peixes, os gametas, após liberados, se encontram na água para a formação de um ovo com vitelo suficiente para a nutrição embrionária até que ocorra a eclosão.

A maioria das espécies com esse tipo de fertilização não apresenta cuidado parental e desovam em substrato aberto, entretanto existem aquelas que ocultam seus ovos, podendo desovar em substratos aderentes ou ninhos [5]. Existem ainda espécies classificadas como guardadoras, que cuidam dos ovos até que ocorra a eclosão, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que mantém os ovos na cavidade oral até que as larvas eclodam e absorvam todo o conteúdo vitelínico [12].

Ativação e motilidade espermática

O ambiente em que os gametas são liberados possuem um papel importante na fertilização, isso porque os espermatozoides desses teleósteos são imóveis nos testículos e no plasma seminal, e são ativados apenas quando entram em contato com o meio externo [13]. A osmolaridade tem um papel fundamental na ativação espermática e sua atuação depende do ambiente em que o espermatozoide será liberado.

O plasma seminal dos teleósteos tem osmolaridade em torno de 300 mOsmol/kg, fazendo com que os espermatozoides estejam imóveis. Essa osmolaridade é diferente da encontrada no ambiente externo, seja ele a água do mar ou doce, e é essa mudança osmótica que tem função de desencadear a motilidade espermática [14]. Dessa forma, espermatozoides de espécies marinhas têm sua ativação iniciada quando entram em contato com um meio de maior osmolaridade (cerca de 1100 mOsmol/kg), enquanto os de espécies de água doce tornam-se móveis em um meio hipotônico em relação a seu plasma [14, 15].

Apesar de a osmolaridade ser o principal fator na ativação espermática, em algumas espécies os íons presentes no plasma também podem ter um importante papel nessa atividade. Em salmonídeos, por exemplo, o íon potássio parece estar relacionado com a manutenção da imobilidade espermática no plasma seminal, podendo sua forma de atuação variar de acordo com o período do ciclo reprodutivo nas espécies, enquanto o íon sódio, que está pouco presente no plasma, possui função na ativação espermática [16].

Na maioria das espécies de teleósteos com fertilização externa, a atividade espermática é breve e tende a diminuir constantemente com o passar do tempo de movimento [10]. A duração da motilidade em ambiente natural está normalmente limitada a curtos períodos, o que está ligado ao baixo aporte de mitocôndrias em seus espermatozoides. A motilidade espermática dura em torno de 30 segundos a alguns minutos, variando largamente entre as espécies [14]. Contudo, espécies de fertilização interna apresentam um tempo de motilidade superior, podendo chegar a atingir 48 horas de movimento [10].

Estruturas gaméticas

O ovócito dos teleósteos possui um córion impenetrável com a presença de um orifício que dá acesso à sua membrana [15]. Esse orifício, chamado de micrópila, encontra-se na zona radiata e é composto por um vestíbulo e um canal micropilar, por onde o espermatozoide passa durante a fertilização [17]. O espermatozoide, para que a fertilização aconteça, deve penetrar a micrópila em um curto intervalo de tempo, visto que esse orifício inicia seu fechamento a partir do momento que entra em contato com o meio externo e começa a hidratar-se [18].

Devido a presença da micrópila, a maioria das espécies possui um espermatozoide com ausência de acrossoma, visto que essa estrutura não é necessária para que haja a fertilização [10]. Dessa forma, a micrópila facilita a entrada do espermatozoide sem que seja necessária a ação de enzimas presentes no acrossoma [7].

O espermatozoide dos teleósteos é formado por cabeça, peça intermediária e cauda, e sua morfologia e organização estrutural variam de acordo com o local da desova, a estratégia de fertilização e a morfologia dos ovócitos [19]. A cabeça possui formato normalmente arredondado e com diâmetro variando de 2 a 4 μm [15]. O núcleo, apesar de geralmente esférico, pode variar o seu formato de acordo com a complexidade da espermatogênese e espermiogênese, e possui cromatina heterogênea ou homogênea e altamente condensada contendo o DNA masculino [7,10,15]. A peça intermediária possui tamanho variável e possui um flagelo central, centríolos e uma quantidade de mitocôndrias que depende da espécie e geralmente varia entre duas e nove, cuja função é gerar energia para motilidade [15]. O espermatozoide possui normalmente apenas um flagelo, e seu comprimento varia a depender da espécie, mas normalmente se encontra entre a 20 e 100 μm [15].

Espécies de fertilização externa costumam apresentar um espermatozoide mais primitivo, ou seja, a maioria com morfologia de cabeça arredondada, sem estrutura acrossomal e peça intermediária pouco aparente, enquanto os espermatozoides de espécies com fertiliza-

ção interna normalmente apresentam alguma modificação, principalmente demonstrando um padrão mais alongado do núcleo e uma peça intermediária mais desenvolvida [10].

Plasma seminal

O sêmen, além de conter os espermatozoides, é composto pelo plasma seminal. Esse plasma tem a função de nutrir, proteger e manter imóveis as células espermáticas até sua liberação no meio externo. Dessa forma, sua composição tem influência direta na qualidade biológica do sêmen e sua função é essencial para o metabolismo, a sobrevivência e a motilidade das células espermáticas [20]. Estudos indicam os testículos, o ducto testicular principal e ductos espermáticos como os principais responsáveis pela produção do plasma seminal em teleósteos [21].

Na composição do plasma seminal normalmente é possível encontrar proteínas, enzimas, lipídeos, açucares, componentes minerais e ácidos, entretanto a quantidade de cada componente costuma variar fortemente entre as espécies e os períodos do seu ciclo de vida [22].

Dentre os componentes do plasma seminal de teleósteos costuma-se encontrar substâncias com poder antioxidante, que atuam na proteção da célula espermática contra o estresse oxidativo [10]. O mecanismo de ação antioxidante é divido em sistema enzimático e não enzimático, em que os antioxidantes enzimáticos são produzidos ou não pelo próprio organismo, podendo-se citar a catalase e a superóxido dismutase, enquanto os antioxidantes não enzimáticos são normalmente de origem dietética, como o ácido ascórbico [23]. Além disso, é possível observar a presença de ácido cítrico, que possivelmente atua se ligando a íons de cálcio e magnésio, o que é importante visto que esses íons podem impedir a atuação do íon potássio, que tem importante papel em manter os espermatozoides imóveis [22].

A quantidade de espermatozoides produzida varia consideravelmente dependendo da espécie [24]. Além disso, pode variar também com a idade e peso do animal e com a sazonalidade. Essa quantificação é feita através da concentração espermática, que analisa a quantidade de espermatozoides por mL de sêmen. Na espécie *Prochilodus brevis* (curimatã comum), por exemplo, a concentração espermática está entre 22 e 32 x 10^9 espermatozoides por mL de sêmen, com a média de volume seminal entre 0,5 e 1,3 mL, em animais induzidos hormonalmente à reprodução [25, 26, 27]. Em tambaqui (*Colossoma macropomum*) a concentração espermática está entre 12 e 27 x 10^9 espermatozoides por mL de sêmen, com a média de volume seminal entre 2 e 5 mL, em animais induzidos hormonalmente à reprodução [28, 29, 30]. Em um estudo realizado sem a indução hormonal em C. macropomum foi possível verificar uma concentração espermática média de 40,5 x 10^9 espermatozoides por mL de sêmen e um volume seminal médio de 0,55 mL [28]. A produção espermática de peixes, quando comparada com mamíferos, é muito alta, o que pode ser explicado pelo elevado número de divisões espermatogoniais [31]. Isso se associa também à necessidade de uma alta concentração espermática por espécies de fertilização externa, aumentando as chances de encontro com o ovócito no ambiente aquoso. Algumas espécies de peixes podem chegar a produzir uma quantidade de células espermáticas dez vezes superior à encontrada em mamíferos, estando na casa dos bilhões de espermatozoides produzidos por grama de testículo a cada dia [32].

Sazonalidade reprodutiva e tratamento hormonal

Assim como nos mamíferos, o padrão hormonal reprodutivo está relacionado ao eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, em que o hipotálamo é ativado por fatores ambientais e químicos, através de sinais captados pelos órgãos sensoriais, e estimula a hipófise na liberação de gonadotrofinas que atuam diretamente nas gônadas.

Nos peixes, a sazonalidade do ciclo reprodutivo é determinada pelas condições ambientais às quais esses animais são expostos, de modo que os sinais ambientais são convertidos em alterações endócrinas que controlam a gametogênese [33]. A maioria das espécies de teleósteos apresenta sazonalidade reprodutiva, enquanto outras se reproduzem continuamente [5].

Dentre as que se reproduzem de forma sazonal, há grande variação em relação ao momento do ano em que a fertilização ocorre, dependendo principalmente do ambiente que a espécie habita. A maioria dos peixes de água doce desova na primavera, enquanto uma parte o faz no período de inundação dos rios e lagos [6]. No caso de peixes tropicais e subtropicais, a desova costuma ocorrer no período chuvoso, quando o ambiente turvo e de águas com fluxo rápido trazem benefícios para o desenvolvimento de suas proles, o que serve como gatilho, juntamente com a temperatura e o fotoperíodo, para a migração e desova [6,7].

Algumas espécies de peixe que desovam na estação chuvosa e com consequente cheia dos rios, realizam a piracema. Esse fenômeno é caracterizado pela migração do habitat de alimentação para o de reprodução, e animais que o realizam são classificados como reofílicos [34, 35]. Essa migração é realizada rio acima, ou seja, o habitat reprodutivo desses peixes se caracteriza por ser na cabeceira dos rios, e é necessária para que fatores ambientais e sociais possam atuar no organismo para que ocorra a desova. Algumas espécies nativas, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e a curimatã (*Prochilodus brevis*), têm o seu período reprodutivo caracterizado pela piracema, o que dificulta sua reprodução natural em cativeiro.

Dessa forma, espécies reofílicas que são criadas em cativeiro precisam ter sua reprodução artificialmente induzida [36]. Essa indução pode ser realizada tanto pela manipulação de fatores ambientais quanto pela aplicação de hormônios exógenos [37].

As técnicas de manipulação de fatores ambientais muitas vezes não são viáveis devido sua complexidade, que pode consistir em simulação de chuvas, mudança no nível da água e manipulação de fotoperíodo e de temperatura [37].

O tratamento hormonal se apresenta como um método mais prático e mais utilizado, e pode ser realizado pela aplicação de hormônios naturais ou sintéticos. O método de indução mais utilizado no Brasil consiste na hipófise desidratada de carpa diluída em soro fisiológico, que é aplicada na base da nadadeira peitoral dos reprodutores ou por via intramuscular [38]. Além desse, existem outros hormônios também utilizados, como a gonadotrofina coriônica humana (hCG), os hormônios liberadores de gonadotrofinas (GnRH) e os antagonistas de dopamina [39, 40]. O protocolo referente à quantidade de hormônio a ser aplicada, ao número de doses, bem como à resposta dos animais à substância depende da espécie e do tipo de hormônio utilizado [40].

O tratamento hormonal, comumente realizado com o uso da hipófise de carpa, permite a propagação artificial para uso comercial, e também possibilita a realização de experimentos e desenvolvimento de tecnologias reprodutivas, visto que permite a manipulação de sêmen fora da estação reprodutiva das espécies ou do sêmen de espécies que necessitariam de estímulo ambiental para a desova, com maior facilidade [6].

Biotecnologias da reprodução de peixes

As novas biotecnologias reprodutivas geram a possibilidade de melhora na quantidade e na qualidade das espécies produzidas, bem como facilidades no transporte e na manutenção de reprodutores. Normalmente, estudos nessa área têm foco nas espécies economicamente importantes ou com grande potencial, mas podem também ser aplicados para espécies que se encontrem ameaçadas em seu ambiente natural.

Análises espermáticas

É comum que a reprodução artificial esteja voltada para os machos. Por isso, a análise espermática e a definição de parâmetros ideais da qualidade dos espermatozoides de peixes são essenciais. Essas análises podem ser empregadas tanto para avaliar a qualidade reprodutiva dos animais do plantel e, portanto, escolha de reprodutores, quanto para avaliar o sucesso de uma biotecnologia reprodutiva empregada.

Dentre essas análises seminais destaca-se a taxa de motilidade espermática, que é um dos principais parâmetros avaliados em estações de piscicultura [41]. Para que essa análise seja realizada é necessário que haja a ativação da motilidade espermática, que é, nas espécies de água doce, usualmente feita por meio da mistura do sêmen em água destilada, água do tanque ou soluções salinas como o cloreto de sódio e o bicarbonato de sódio [42]. O sêmen ativado pode ser analisado de maneira subjetiva, em que um observador treinado verifica a motilidade através de um microscópio óptico e designa uma porcentagem de zero a 100 [41].

Entretanto, mais recentemente, programas computacionais podem ser empregados para que a análise seja feita objetivamente. Para isso, a imagem do microscópio, que está acoplado a uma câmera e a um computador, é analisada por um programa que designa essa taxa de motilidade espermática. O sistema de análise seminal auxiliado por computador, conhecido como CASA, é mais utilizado atualmente. Além da motilidade, os softwares disponíveis, como o *Sperm Class Analyzer* (SCA), podem dar resultados referentes a outras variáveis cinéticas, como diversos tipos de velocidade.

Além da taxa de motilidade, a duração da motilidade também se mostra como uma importante análise, visto que possui forte influência na capacidade de fertilização do espermatozoide. Isso porque o espermatozoide precisa penetrar a micrópila antes de seu fechamento, fazendo com que maiores durações de motilidade possam aumentar suas chances. Para a realização dessa análise, um cronômetro é acionado no momento da adição da solução ativadora e interrompido quando restarem 10 a 20% de espermatozoides móveis [41]. O tipo de solução ativadora e sua osmolaridade e temperatura podem influenciar na duração de motilidade espermática [43].

Outra análise realizada é a de morfopatologias espermáticas, que verifica a integridade das estruturas do espermatozoide, como cabeça e cauda. Essa análise é importante visto que uma morfologia espermática normal é essencial para um bom desempenho dos espermatozoides [44]. Para sua realização, os espermatozoides são fixados, corados, observados em microscópio óptico e analisados subjetivamente quanto sua forma, tendo suas morfopatologias classificadas. Essa classificação, para diversas espécies, é padronizada pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, entretanto para espécies de peixes ainda não há um parâmetro oficial a ser seguido, sendo utilizadas referências encontradas na literatura.

A integridade de membrana também pode ser realizada como uma técnica auxiliar à motilidade na identificação de espermatozoides vivos e mortos. Essa técnica consiste em corar, utilizando eosina e nigrosina, os espermatozoides com membrana rompida, que adquirem uma coloração avermelhada devido à permeabilidade da eosina. Com isso é possível perceber também as células com membrana intacta, visto que essas não terão permeabilidade à eosina e permanecerão incolores, sendo possível visualiza-las devido ao contraste de fundo causado pela nigrosina [45]. Além disso, mais recentemente, sondas fluorescentes, como o iodeto de propídio e o SYBR 14, vêm começando a ser utilizadas para a realização dessa análise no espermatozoide de peixes [41].

Atualmente, outras análises, como a integridade de DNA espermático, também podem ser realizadas a fim de obter uma melhor noção da qualidade espermática e, principalmente, da extensão de danos causados pelas biotecnologias reprodutivas, sendo importante visto que apesar de móveis e morfologicamente normais, os espermatozoides podem possuir danos no DNA que influenciam na capacidade fertilizante ou no desenvolvimento da prole. Essa análise pode ser realizada por métodos como o da dispersão da cromatina espermática, que se utiliza de uma solução ácida que causa desnaturação e remoção de proteínas nucleares, isso leva à formação de *loopings* de DNA disperso que geram um halo em volta da cabeça do espermatozoide com DNA íntegro, o que não ocorre com o DNA fragmentado [46]. Outro método comumente utilizado para a verificação da integridade do DNA é o método do cometa, também conhecido como eletroforese em microgel. Nesse teste, as células espermáticas sofrem lise, liberando proteínas associadas ao DNA e permitindo o relaxamento da fita. A lâmina é então levada a eletroforese, que faz com que o DNA fragmentado migre em direção ao ânodo, formando uma estrutura parecida com a cauda de um cometa, enquanto o DNA íntegro se concentra na região semelhante a cabeça do cometa, isso é analisado em microscópio de fluorescência para verificar a extensão dos danos [47].

Resfriamento seminal

As biotecnologias voltadas para a conservação seminal vêm assumindo um papel relevante na aquicultura e na conservação dos recursos genéticos [48]. Dentre essas técnicas estão o resfriamento, a congelação e a vitrificação do sêmen de determinadas espécies de peixe.

O resfriamento mantém a viabilidade espermática por um breve período de tempo, sendo por isso também conhecido como preservação do sêmen a curto prazo. Essa técnica consiste em manter a viabilidade espermática por um período de horas ou dias em temperaturas

de refrigeração, aproximadamente 4°C, podendo esse sêmen ser utilizado posteriormente para a fertilização [49]. O resfriamento age reduzindo a atividade metabólica e a ativação espontânea, devido ao uso de substâncias diluidoras e temperatura adequadas [50].

O sucesso do resfriamento é dependente de fatores como o fornecimento e a troca de gases, a prevenção do desenvolvimento de bactérias, a prevenção da dessecação e a manutenção da quiescência espermática [51]. Além disso, o uso de substâncias diluidoras contribui com o aumento da superfície de contato entre o meio e os espermatozoides, o que facilita as trocas gasosas [41]. O diluente, portanto, diminui a competição espermática por espaço e oxigênio, bem como contribui com a redução da taxa metabólica espermática [52].

Em estudos realizados com a espécie piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) verificou-se o NaCl 200 mM e a solução Saad (mM: 200 NaCl, 30 Tris) como bons diluentes para resfriamento de seu sêmen [53]. A água de coco em pó específica para peixes (ACP-104) pode ser utilizada como diluente, tendo apresentado bons resultados no resfriamento seminal de espécies como a curimatã (*Prochilodus brevis)* [54] e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) [55, 56]. A solução BTS (Beltsville Thawing Solution) também já foi utilizada, com bons resultados, para o resfriamento de espécies como a curimba (*Prochilodus lineatus*) [57] e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) [56]. Outro diluente utilizado no resfriamento seminal de peixes é a glicose, usada em espécies como curimba (*Prochilodus lineatus*) [58].

Congelação do sêmen

A congelação de sêmen consiste na conservação dos gametas masculinos por meio de congelação utilizando nitrogênio líquido, que está a uma temperatura de -196 °C. Essa biotecnologia mantem a estrutura e a funcionalidade dos espermatozoides conservadas, mantendo-os inativos e viáveis por tempo indeterminado [59, 60]. O processo de congelação espermática pode ser dividido em etapas: coleta seminal, avaliação dos parâmetros seminais *in natura*, adição de solução diluidora, envase e tempo de equilíbrio, congelamento, armazenamento, e posterior descongelamento e fertilização [61].

Essa técnica é realizada por meio da diminuição da temperatura do sêmen de forma gradual até seu armazenamento em nitrogênio líquido. Os métodos de congelação seminal mais utilizados para espécies de peixe nativas são a caixa térmica de poliestireno e o *dry shipper* [42]. O método que utiliza a caixa térmica de poliestireno consiste na inserção de nitrogênio líquido em seu interior, deixando as amostras em bandejas metálicas suspensas alguns centímetros, ficando em contato apenas com seu vapor [62]. O *dry shipper*, por sua vez, é um botijão de alumínio com um material poroso em seu interior, fazendo com que o nitrogênio ali inserido seja absorvido e apenas seu vapor seja liberado gradativamente, gerando uma curva de congelação [63]. Além desses métodos, existe ainda a congelação com máquinas programáveis, que controla o resfriamento gradual das amostras, visto que a temperatura em seu interior, bem como a evolução dessa temperatura, pode ser programada com precisão [64].

A congelação espermática permite atingir objetivos como o fornecimento de subsídios para a formação de bancos de germoplasma, a troca de material genético entre pisciculturas,

a disponibilidade de sêmen durante épocas não convencionais, a viabilidade de eventuais programas de hibridização e o transporte de material genético através de longas distâncias com baixo custo e maior segurança [48, 65, 66]

Durante o processo de congelação existem alguns fatores que podem gerar estresse às células espermáticas. Dentre eles estão a taxa de diluição, a temperatura e o tempo de equilíbrio, a curva de congelação e de descongelação e, principalmente, a formação de cristais de gelo intra e extracelulares. A formação de cristais ocorre quando se submete o sêmen à temperaturas inferiores a 0°C e, devido aos danos que causa à célula, medidas devem ser tomadas para minimizar sua incidência.

Para isso, é necessário que a congelação seminal seja realizada utilizando uma solução diluidora, composta por diluente e crioprotetor. Essa solução permite que a célula espermática se mantenha viável durante os processos de congelação e descongelação, visto que tem a função de nutrir e proteger os espermatozoides contra as crioinjúrias [67]. O diluente tem a função de aumentar o volume seminal, facilitando sua distribuição em doses e aumentando o volume seminal, além de servir como fonte de energia para os espermatozoides após a descongelação, sendo por isso geralmente composto por sais e/ou carboidratos. Um diluente ideal precisa ser isotônico, estável, estéril, ter condutividade térmica elevada, e servir de carreador de crioprotetores [68]. Os crioprotetores devem possuir baixa toxicidade e alta solubilidade em água, e podem possuir ação interna ou externa à célula. Os crioprotetores internos são imprescindíveis e atuam dificultando a formação de micro cristais de gelo no interior do espermatozoide. Os crioprotetores de ação extracelular, por outro lado, agem sem que haja penetração na célula, recobrindo sua superfície e estabilizando a membrana espermática [67].

A solução diluidora composta por glicose 5% adicionada do crioprotetor interno Dimetilsufóxido (DMSO) 10% e do crioprotetor externo gema de ovo 10% foi testada para as espécies brasileiras *Brycon orbignyanus*, *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Salminus maxillosus*, *Leporinus elongatus* e *Pseudoplatystoma corruscans*, tendo apresentado bons resultados [59]. Essa mesma composição de glicose e DMSO também se mostrou eficiente na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis* [69]. Apesar de a solução diluidora composta por glicose 5%, Metilglicol 10% e gema de ovo 5% ter demonstrado ser a mais adequada para a congelação do sêmen de tambaqui [66], trabalhos recentes mostram a possibilidade de utilização da lecitina de soja como substituinte da gema de ovo como crioprotetor externo, utilizando glicose e DMSO [70]. A substituição da gema de ovo por lipoproteínas de origem vegetal, como a lecitina de soja, vem sendo cada vez mais indicada principalmente por conta dos problemas sanitários relacionados ao seu uso, devido a uma maior probabilidade de contaminação microbiana que pode levar a uma diminuição da capacidade fertilizante do espermatozoide [71]. Além da glicose, o ACP-104 também se mostrou eficiente como diluente na congelação seminal de espécies como carpa comum (*Cyprinus carpio*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), curimba (*Prochilodus lineatus*) e piapara (*Leporinus obtusidenss*) [72, 73, 74]. Esse diluente consiste na água de coco em pó liofilizada (ACP) e possui os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in natura*, porém é padro-

nizada e eficientemente conservada, o que facilita sua comercialização [75]. Esse diluente, desenvolvido na Universidade Estadual do Ceará, foi usado inicialmente para espécies de mamíferos, sendo posteriormente adaptado para a utilização no sêmen de peixes, recebendo a classificação de ACP-104 e obtendo sucesso [74].

Vitrificação seminal

Além do resfriamento e da congelação seminal, a vitrificação também pode ser utilizada para a conservação dos gametas. A vitrificação é um método de criopreservação rápida, ou seja, não há a diminuição gradual da temperatura, visto que o sêmen é inserido diretamente em nitrogênio líquido, havendo uma brusca mudança de temperatura. Para isso, o método tradicional consiste na utilização de uma alta concentração de crioprotetores permeáveis, o que pode ser extremamente tóxico para a célula e levar a danos. Por outro lado, a vitrificação tende a não formar cristais de gelo intracelulares, além de não haver necessidade de equipamentos específicos de congelação.

A vitrificação seminal em peixes ainda é considerada nova e foi testada com baixo sucesso em algumas espécies. Em tambaqui (*C. macropomum*) a vitrificação do sêmen foi realizada comparando-se três diferentes concentrações do crioprotetor interno DMSO. Além disso, comparou-se os resultados com os obtidos por meio de métodos de congelação lenta. Nas três concentrações de crioprotetor testadas os resultados da vitrificação não se mostraram promissores, com taxas de motilidade e fertilização nulas, sendo sempre inferiores aos obtidos na criopreservação convencional [76]. Por outro lado, na vitrificação do sêmen de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) utilizando meio de vitrificação adicionado de diferentes porcentagens de plasma seminal foi possível observar resultados de taxas de motilidade e fertilização superiores a 40% [77]. Acredita-se que espécies marinhas e de água doce respondam de forma diferente à alta concentração de crioprotetores internos, principalmente por conta da pressão osmótica que essas substâncias geram, fator mais bem respondido pelos espermatozoides de espécies marinhas [78].

Uma metodologia mais recente de vitrificação consiste na não utilização de crioprotetores internos. O primeiro relato de sucesso dessa metodologia em peixes foi realizado em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando sacarose, BSA e componentes do próprio plasma seminal, porém sem que houvesse a adição de crioprotetores internos, e obteve resultados considerados promissores [79]. Entretanto, essa técnica é ainda mais iniciante do que a vitrificação convencional e poucos estudos foram desenvolvidos em peixes.

Considerações finais

Compreender aspectos reprodutivos de peixes é de extrema importância não só para o manejo reprodutivo em pisciculturas, mas também para o desenvolvimento e aplicação de biotecnologias reprodutivas. O grupo dos peixes é muito diverso e várias espécies apresentam particularidades que devem ter a atenção necessária. Entretanto, o estudo de características reprodutivas gerais, apesar de básico, se faz necessário visto que os peixes apresentam muitas

particularidades, e a maioria das biotecnologias reprodutivas são adaptadas de estudos iniciais em mamíferos ou outras classes animais.

Apesar de ainda ser iniciante, principalmente em relação às espécies de mamíferos, as biotecnologias reprodutivas em peixes vêm crescendo a cada ano, principalmente com estudos relacionados ao desenvolvimento de protocolos para o resfriamento e a congelação seminal de espécies comercialmente importantes. O próximo passo é fazer com que, cada vez mais, essas biotecnologias sejam de fato empregadas na produção e conservação desses animais.

Referências bibliográficas

[1] Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAO). The state of world fisheries and aquaculture: Meeting the sustainable development goals. Roma, Italia: FAO, 2018. p.227.

[2] Miliorini A. Ativadores e concentrações de metanol e dimetilsulfóxido na qualidade do sêmen criopreservado de curimba (*Prochilodus lineatus*). 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

[3] Vieira MJAF, Carvalho MAM, Salmito-vanderley CSB, Salgueiro CCM; Viveiros ATM, Moura AAAN, Nunes JF. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. Arch. Zootec 2011; 60 (232): 1263-1270.

[4] Billard R, Cosson J, Noveiri SB, Poukazemi M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a rewiew. Aquaculture 2004; 1-9.

[5] Vazzoler AEAM. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá: EDUEM 1996; 169p.

[6] Woynarovich E, Horvath L. A propagação artificial de peixes de águas tropicais: Manual de extensão. Brasília, FAO/CODEVASF/CNPq 1983.

[7] Rizzo E, Bazzoli, N. Reprodução e embriogênese In. Baldisserotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, 2014. 336p.

[8] Ferreira PELM. Ultrassonografia modo-B como uma ferramenta não invasiva para determinação sexual e avaliação da maturação gonadal em *Prochilodus brevis* (Characiformes, Prdochilodontidae). Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil. 2019, 52p.

[9] Meffe GK, Snelson Jr FF. An ecological overview of poeciliid fishes, pp. 13-32. In: Ecology and evolution of livebearing fishes (Poeciliidae). New Jersey: Prentice Hall 1989.

[10] Coward K, Bromage NR, Hibbitt O, Parrington J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries 12: 33–58, 2002.

[11] Jobling M. Environmental Biology of Fishes. Chapman and Hall, London 1995; 455 pp.

[12] Torres IBM. Considerações sobre o número e diâmetro de ovos em incubação oral pela tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (L., 1766), em indivíduos de até 112,3g de peso. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Federal do Ceará. Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil. 1995, 21p.

[13] Cosson J, Billard R, Cibert C, Dréanno C, Suquet M. Ionic factors regulating the motility of fish sperm. The male gamete: from basic science to clinical applications, Cache River Press 1999; p.162-186, 1999.

[14] Cosson J. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. Aquaculture International 2004; v. 12, p. 69–85.

[15] Cosson J. Fish Sperm Physiology: Structure, Factors Regulating Motility, and Motility Evaluation. Biological Research in Aquatic Science 2019.

[16] Alavi SMH, Cosson J Sperm motility in fishes: (I) effects of pH and temperature. Cell Biol Int 2005; 29:101–110.

[17] Ganeco LN, Nakaghi LSO. Morfologia da micrópila e da superfície dos ovócitos de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Osteichthyes, Characidae), sob microscopia eletrônica de varredura. Acta Scientiarum: Biological Sciences Maringá 2003; v. 25, p. 227-231.

[18] Nakatani HK, Agostinho AA, Baumgartner G, Bialetzki A, Sanches PV, Makrakis MC, Pavanelli CS. Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação. Maringá: EDUEM, 2001.

[19] Murgas LDS, Paulino MS, Palhares PC, Miliorini AB, Alves E, Felizardo VO. Ultrastructural and Morphometric Analysis of Gametes in Neotropical Teleost Fishes. Journal of Fisheries Sciences 2017; v. 11, p. 56-61.

[20] Bozkurt Y, Gretmen FO, Kokçu O, Erçin U. Relationships between seminal plasma composition and sperm quality parameters of the *Salmo trutta macrostigma* (Dumeril, 1858) semen: with emphasis on sperm motility. Czech Journal of Animal Science 2011; n. 56, v. 8, p.355–364.

[21] Lahnsteiner F, Patzner RA, Weismann T. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). Reprodution Nutrition Development 1993; v.33, p. 349–360.

[22] Piironen J, Hyvärinen H. Composition of the milt of some teleost fishes. J Fish Biol 1983; 22, 351-361.

[23] Lopes JT, Salmito-Vanderley CSB, Almeida-Monteiro PS. Presença de antioxidantes no sêmen de teleósteos e sua utilização na suplementação de meios de congelação seminal. Rev. Bras. Reprod. Anim 2016, v.40, n.1, p.29-34.

[24] Murgas LDS, Felizardo VO, Ferreira MR, Andrade ES, Veras GC. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. Rev. Bras. Reprod. Anim 2011; v.35, n.2, p.186-191.

[25] Lopes JT, Pinheiro JPS, Nunes LT, Pinheiro RRR, Souza MEM, Almeida PS, Nascimento RV, Campello CC, Salmito-Vanderley CSB. Avaliação de diferentes crioprotetores e taxas de diluição na criopreservação seminal de *Prochilodus brevis*. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2014, v.38, n.3, p.170-175.

[26] Nunes LT, Oliveira MS, Lopes JT, Souza MEM, Pinheiro RRR, Campello CC, Salmito- Vanderley CSB. Cryopreservation of Prochilodus brevis semen: freezing media and thawing rates. Semina: Ciências Agrárias, Londrina 2016, v. 37, n. 3, p. 1643-1654.

[27] Almeida-Monteiro PS, Oliveira-Araújo MS, Pinheiro RRR, Lopes JT, Ferreira YM, Montenegro AR, Melo-Maciel MAP, Salmito-Vanderley CSB. Influence of vitamins C and E on the quality of cryopreserved semen *Prochilodus brevis* (Prochilodontidae, Teleostei). Semina: Ciências Agrárias 2017, v. 38, n. 4, s.1, p. 2669-2680.

[28] Vieira MJAF, Carvalho MAM, Salmito-Vanderley CSB, Salgueiro CCM, Viveiros ATM, Moura AAAN, Nunes JF. Características do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em latitude equatorial. Archivos de zootecnia 2011, v. 60, n. 232, p. 1264.

[29] Melo-Maciel MAP, Leite-Castro LV, Leite JS, Oliveira MS, Almeida-Monteiro PS, Nunes JF, Salmito-Vanderley CSB. Aloe vera na criopreservação do sêmen de tambaqui (*Colossoma macropomum*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2015, v. 67, n. 3, p. 945-949.

[30] Oliveira MS, Almeida-Monteiro PS, Nunes LT, Linhares FRA, Pinheiro JPS, Pinheiro RRR, Ferreira FO, Campelo CC, Salmito-Vanderley CSB. Cryopreservation of tambaqui semen using a dry shipper and a programmed freezing machine. Semina: Ciências Agrárias, Londrina 2016, v. 37, n. 4, p. 2167-2180.

[31] Billard R, Cosson J, Crim LW, Suquet M. Sperm physiology and quality. In: Bromage NR, Roberts RJ. (eds): Brood Stock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, Oxford 1995; p. 25–52.

[32] Billard R. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING, G. E (ed.). Marshall' s Physiology of Reproduction, 4.ed. Endinburgh: Churchill Livingstone 1990a; cap. 3, p. 183- 213.

[33] Enright W. Compêndio de Reprodução Animal. Intervet. 2007.

[34] Araújo AS. Variação temporal da freqüência de captura e sazonalidade reprodutiva de *Prochilodus cearensis* Steindachener, 1911 (Characiformes,Prochilodontidae) no açude Itans, Caíco/RN. 1998. 86f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio grande do Norte, Natal, 1998.

[35] Gurgel LL, Verani JR, Chellappa S. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid region of Brazil. The Scientific World Journal (Ecol. Domain) 2012, p.1-7.

[36] Orfão LH. Indução da desova e espermiação de peixes em criações comerciais. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2013; v. 37, n. 2, p. 192-195.

[37] Zaniboni-Filho E, Weingartner M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev Bras Reprod Anim 2007; v.31, n.3, p.367-373.

[38] Harvey B, Carolsfeld J. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: International Development Research Centre 1993; p. 144.

[39] Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. Gen Comp Endocr 2010; v.165, n.3, p.516-534.

[40] Baldisserotto B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. 3.ed. Santa Maria: UFSM 2013; 352p.

[41] Viveiros ATM, Orfão LH, Leal MC. Biologia e conservação de espermatozoides. In. Baldisserotto B, Cyrino JEP, Urbinati EC. Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce. Jaboticabal: FUNEP; UNESP, 2014. 336p.

[42] Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiology and Biochemistry 2009; 35:137-150.

[43] Alavi SMH, Rodina M, Viveiros ATM, Cosson J, Gela D, Boryshpolets S, Linhart O. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius L.*). Theriogenology 2009, v. 72, p. 32–43.

[44] Kavamoto ET, Barnabe VH, Campos BES, Andradetalmelli EF. Anormalidades morfológicas nos espermatozoides do curimbatá, *Prochilodus lineatus* (Steindachner, 1881) (Osteichthyes, Characiformes, Prochilodontidae). Boletim do Instituto de Pesca 1999; v. 25, p. 61-66.

[45] Bloom E. A rapid staining method using eosin-nigrosin to distinguish between live and dead spermatozoa. Animal Breeding Abstracts 1950; 18, 1390.

[46] Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Methodfor the Determination of Sperm DNA Fragmentation 2003, Journal of Andrology, Vol. 24, No. 1.

[47] Collins, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. Mol Biotechnol 2004, 26, 249.

[48] Maria NA, Azevedo HC, Carneiro PCF. Criopreservação de sêmen de peixes no contexto do agronegócio da piscicultura. In: Tavares-dias M. (Org.). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Amapá: Embrapa Amapá 2009; v. 1, p. 47- 63.

[49] Murgas LDS, Miliorini AB, Franciscatto RT, Maria AN. Viabilidade espermática do sêmen de Piracanjuba (Brycon orbignyanus) resfriado a 4oC. Revista Brasileira de Zootecnia 2004; v. 33, n. 6, p. 1361-1365.

[50] Billard R, Cosson J, Noveiri SB, Poukazemi M. Cryopreservation and short-term storage of sturgeon sperm, a rewiew. Aquaculture 2004; 1-9.

[51] Stoss J, Donaldson EM. Preservation of fish gametes. In: International symposium reproduction physiology fish. Wageningen. Proceedings Wageningen 1982; p. 114-122.

[52] Carolsfeld J, Harvey B. Conservação de recursos genéticos de peixes: teoria e prática. In: Curso de Treinamento Brasileiro. Victoria, Canadá: World Fisheries Trust 1999; 41p.

[53] Maria AN, Viveiros ATM, Orfão LH, Oliveira AV, Moraes GF. Effects of cooling and freezing on sperm motility of the endangered fish piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Characiformes, Characidae). Anim. Reprod. 2006; v.3, n.1, p.55-60.

[54] Nascimento RV, Leite-castro LV, Montenegro AR, Oliveira-Araújo MS, Lopes JT, Almeida- Monteiro PS, Ferreira YM, Salmito-Vanderley CSB. Influência do tempo de resfriamento e soluções diluentes sobre a congelabilidade do sêmen de *Prochilodus brevis*. Acta Scientiae Veterinariae 2017; v. 45, p.1-9.

[55] Oliveira FCE. Resfriamento do sêmen de Colossoma macropomum em água de coco em pó (acp-104) associada à crioprotetores - estudo de toxicidade. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brazil. 2012, 66p.

[56] Garcia RRF, Vasconcelos ACN, Povh JN, Oberst ER, Eloy LR, Streit-Junior DP. Different extenders solutions for tambaqui semen cooling. Pesq. agropec. Bras 2016; vol.51 no.6

[57] Viveiros ATM, Taffarel TM, Leal MC. Osmolality and composition of the extender during the cold storage of *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) sperm. Neotrop. Ichthyol 2014; vol.12 no.3.

[58] Orfão LH, Maria AN, Nascimento AF, Isaú ZA, Viveiros ATM. Sperm fertility of the subtropical freshwater streaked prochilod *Prochilodus lineatus* (Characiformes) improved after dilution and cold storage. Aquaculture Research, v. 41, p. 679–687, 2010.

[59] Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. Journal of Fish Biology 2003; v. 63, p. 472-489.

[60] Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: principles and recent advancement on cryopreservation of diferente type of tissues. Organogenesis 2009; v. 5, n. 3, p. 119–126.

[61] Maria NA, Carneiro PCF. Criopreservação de sêmen de peixes no Brasil: estado da arte e perspectivas futuras. Ciência Animal 2012, v. 22, n. 1, p. 124-131. (entre 47 e 48)

[62] Salmito-vanderley CSB, Linhares FRA, Carvalho MAM, Oliveira MS, Nunes JF. Biotécnicas aplicadas a reprodução de ciprinídeos. Acta Veterinaria Brasilica, 2014, v. 8, n. 2, p. 292-298.

[63] Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni Filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. Journal of Fish Biology 2003, v. 63, p. 472-489.

[64] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Guidelines for the Cryoconservation of Animal Genetic Resources 2010, p. 170.

[65] Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Paramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology 2010; v. 26, p. 623-635.

[66] Carneiro PCF, Azevedo HC, Santos JP, Maria AN. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: Extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. Cryoletters 2012; v. 33, n. 5, p. 285-393.

[67] Salmito-vanderley CSB, Vieira MJAF, Leite LV, Oliveira FCE, Linhares FRA, Salgueiro CCM, Nunes JF. Meios de congelação para conservação de sêmen de peixes da família Characidae. Ciência Animal 2012; 22(1): 255-268.

[68] Legendre M, Billard R. Cryopreservation of rainbow trout sperm by deep-freezing. Reproduction Nutrition Development 1980; v. 20, n. 6, p. 1859-1868.

[69] Nunes LT, Oliveira MS, Lopes JT, Souza MEM, Pinheiro RRR, Campello CC, Salmito- Vanderley CSB. Cryopreservation of *Prochilodus brevis* semen: freezing media and thawing rates. Semina: Ciências Agrárias 2016; 37(3): 1643-1654.

[70] Lopes JT. Lecitina de soja e antioxidantes na composição de meios de congelação espermática de Tambaqui (*Colossoma macropomum*). Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil. 2019, 76p.

[71] Bousseau S, Brillard JP, Guienne BML, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology, 1998, v. 50, p. 699–706.

[72] Linhares FRA, Salmito-Vanderley CSB, Carvalho MAM, Pinheiro RRR, Oliveira FCE, Nunes JF. Cinética e morfologia de espermatozoides de carpa comum criopreservados em água de coco em pó ACP-104. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2015; 67(5), 1313-1320.

[73] Vieira MJAF. Caracterização do sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum* (curvier, 1818) e criopreservação em diluentes à base de água de coco em pó (ACP-104). Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil. 2010, 115p.

[74] Viveiros ATM, Maria NA, Órfão LH, Carvalho MAM, Nunes JF. Powder coconut water (ACP®) as extender for semen cryopreservation of Brazilian migratory fish species. Cybium–Int. J. Ichthyol 2008; 32, 215.

[75] Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM. Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., São Paulo 2006, v.43, n.6, p.767-774.

[76] Varela-Junior AS, Goularte KL, Alves JP, Pereira FA, Silva EF, Cardoso TF, Jardim RD, Streit-Junior DP, Corcini CD. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. Animal Reproduction Science 2015, v. 157, pp. 71-77

[77] Figueroa E, Merino O, Risopatrón J, Isachenko V, Sánchez R, Effer B, Isachenko E, Farias JG, Valdebenito I. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. Theriogenology 2015, 83 (2), pp. 238-245.

[78] Xin M, Siddique MAM, Dzyuba B, Cuervas-Uribe R, Shaliutina-Kolešová A, Linhart O. Progress and challenges of fish sperm vitrification: A mini review. Theriogenology 2017, v. 98, pp. 16-22.

[79] Merino O, Risopatrón J, Sanchéz R, Isachenko E, Figueroa E, Valdebenito I, Isachenko V. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. Animal Reproduction Science 2012, v. 124, i. 1–2, pp. 125-131.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Tecnologías de semen en cérvidos

Rodolfo Ungerfeld
rungerfeld@gmail.com
Departamento de Biociencias Veterinarias, Facultad de Veterinaria,
Universidad de la República, Uruguay

Julián Santiago-Moreno
Departamento de Reproducción, INIA, España

Abstract: Knowledge in the use of reproductive technologies in cervids is considerably less than in domestic ruminants. Although the information available on domestic ruminants allows faster progress, the great variability between cervid species, including variability in their reproductive physiology, makes the direct use of this information difficult. For this reason, it is necessary to know in depth the reproductive biology of each species and to adapt and validate the different technologies. In turn, except in some species raised in productive systems, progress is slow due to the difficult access to animals, working conditions, and the alterations made by handling the animals. In this review, information is updated on some physiological aspects to consider when planning the use of technologies that include semen management, collection management, some characteristics of cervid semen, and its cryopreservation. As mentioned, this should be considered a general reference, but it is not directly applicable to all species of deer.

Resumen: El conocimiento en el uso de tecnologías reproductivas en cérvidos es bastante menor que en los rumiantes domésticos. Si bien la información disponible en rumiantes domésticos permite un avance más rápido, la gran variabilidad entre especies de cérvidos, incluyendo variabilidad en su fisiología reproductiva, dificulta el uso directo de esta información. Por ello es necesario conocer en profundidad la biología reproductiva de cada especie, y adecuar y validar las distintas tecnologías. A su vez, salvo en algunas especies criadas en sistemas productivos, el avance es lento por el difícil acceso a los animales, condiciones de trabajo, y las propias alteraciones realizadas por el manejo de los animales. En esta revisión se actualiza información sobre algunos aspectos fisiológicos a considerar al momento de planificar el uso de técnologías que incluyan el manejo del semen, los manejos para la colecta, algunas características del semen de los cérvidos y su criopreservación. Como se mencionó, esto debe ser considerado una referencia general, pero no es aplicable en forma directa en cualquier especie de ciervo.

Keywords: semen, spermatozoa, deer.

Palavras-chave: semen, espermatozoides, ciervos.

Introducción

Existen alrededor de 200 especies de rumiantes salvajes [1], la mayoría de los cuales son bóvidos y cérvidos. Cervidae es una familia del Orden Artiodactyla, incluida en el Infraorden Pecora del Suborden Ruminantia. En esta familia existen unas 40 especies con más de 200

subespecies de cérvidos, lo que abarca cerca de 50 millones de animales viviendo en condiciones silvestres [2]. Originalmente, los rumiantes vivientes de forma nativa se encontraban en todos los continentes excepto Antártida y Oceanía, aunque actualmente la mayoría de las especies se encuentran en África y Eurasia [3]. Mientras que los bóvidos y cérvidos se distribuyen en casi todo el mundo, el rango de las familias restantes es mucho más restringido. En América del Sur se encuentran cérvidos, pero no bóvidos en estado silvestre. La amplia variabilidad tanto en regiones en que se encuentran los cérvidos, hábitats, condiciones, etc, determinaron que exista una amplia variabilidad de características fisiológicas como ecológicas, incluyendo las estrategias reproductivas, en las diferentes especies de cérvidos. Por ejemplo, dentro de los cérvidos se encuentras especies como el pudú (*Pudu puda*), que pesa de 6 a 8 kg hasta los alces (*Alces alces*), que pesan más de 800 kg [4]. Además, existen varias especies de cérvidos amenazadas de extinción.

Por otra parte, se han domesticado o semidomesticado varias especies de cérvidos para ser utilizadas como especies productivas. Por ejemplo, en Nueva Zelanda existen alrededor de 2000 productores de ciervos, con un total de 1 millones de animales [5]. La producción de ciervos tiene varios objetos, como ser carne, cuero, astas y la felpa que recubre las astas durante su período de crecimiento. A su vez, los cérvidos son una de las principales especies utilizadas en cotos de caza, y son una de las especies emblemáticas en zoológicos, reservas y estaciones de conservación.

La incorporación de tecnologías reproductivas tiene un alto impacto potencial, tanto para la cría en cautiverio como para los programas de conservación. Sin embargo, las tecnologías que se encuentran bien desarrolladas para los rumiantes domésticos (inseminación artificial, transferencia de embriones, fertilización *in vitro*, etc.) no se adaptan en forma directa para su aplicación en estas especies. Una de las principales limitantes para el desarrollo de programas de reproducción asistida en rumiantes silvestres es la falta de conocimiento sobre las características reproductivas fisiológicas de cada especie, lo que implica que es necesario entender en profundidad la fisiología de las mismas para poder aplicar las diferentes biotecnologías. Por ello, en esta revisión se analizan algunos aspectos de las influencias ambientales que pueden afectar la fisiología reproductiva, especialmente sobre la calidad seminal. Luego se presenta como un punto central lo correspondiente a las tecnologías de captura para colección de semen, para luego presentar un panorama del estatus del conocimiento en las tecnologías del semen actualmente en desarrollo.

Influencias ambientales sobre la calidad seminal: 1. Estacionalidad reproductiva

Existen especies de ciervos que presentan reproducción estacional y otros con cambios muy leves, con muy poca variación estacional en las características reproductivas. Algunas presentan variaciones en su actividad a lo largo del año, pero no en forma sincronizada entre diferentes individuos. Las especies en que la reproducción ocurre solo durante parte del año son denominadas reproductoras estacionales [6]. La estacionalidad reproductiva es una consecuencia evolutiva de las especies para que los partos ocurran en el momento más propicio para la supervivencia de sus crías, lo que en climas templados ocurre generalmente

en primavera [7]. Los machos deben desplegar su máximo potencial reproductivo al inicio de la estación reproductiva, por lo que dado el tiempo que requiere la espermatogénesis los machos deben adelantar el inicio de la reproducción [7]. Aunque el tiempo exacto varía según la especie, en forma genérica la espermatogénesis dura alrededor de 50 días [8]. Sin embargo, esto es aún más completo, dado que existen casos paradigmáticos como el ciervo Axis, una especie originaria de India, pero que es utilizada en sistemas productivos en Nueva Zelanda [9], Australia [10] y Estados Unidos, o habita como fauna invasora en forma muy exitosa parte del cono sur de Sudamérica. De acuerdo a la población que se estudie, el ciervo Axis puede ser descrito como una especie con reproducción estacional [11] o con cambios a lo largo del año no sincronizados, no estacionales ni vinculados a la concentración de melatonina [12]. En sistemas productivos en Australia se observan partos todos los meses, pudiendo incluso las hembras llegar a tener 3 partos cada 27 meses [9], siendo que su gestación dura aproximadamente 7,5 meses. La mayor parte de los mamíferos responden a diversas señales para comenzar o finalizar la estación reproductiva. En general se considera que el fotoperiodo y la variación de la duración absoluta del día son las principales señales en los rumiantes silvestres [13].

En especies de ciervos con reproducción estacional hay variaciones a lo largo del año en el peso corporal, tamaño testicular, y del perímetro del cuello de los machos, llegando a su máximo desarrollo durante la estación reproductiva [14,15]. Antes de la estación reproductiva se produce un aumento de la concentración de testosterona [16,17], la que se asocia con un aumento del número de espermatozoides en el eyaculado y se alcanza el máximo porcentaje de espermatozoides con morfología normal [18]. Además, al inicio de la estación reproductiva se observan los mayores diámetros de los túbulos seminíferos y del epidídimo, número de espermatogonias en los túbulos seminíferos, y un aumento en el tamaño, peso y actividad de las glándulas sexuales secundarias [19]. En muchas especies de cérvidos, se oscurece el color del pelaje [20] y se observa un mayor tamaño y actividad de las glándulas apócrinas y sebáceas del cuerpo [16] como consecuencia del aumento de testosterona.

Los cérvidos también presentan ciclos anuales de las astas. Anualmente las astas caen, crecen nuevamente, en general rodeadas de una capa de piel (felpa), que luego cae para permanecer durante el resto del año con astas limpias. El ciclo de las astas está relacionado con los cambios anuales de concentraciones plasmáticas de testosterona (ver revisiones: [21,22]). El crecimiento comienza con concentraciones bajas de testosterona, aunque la finalización del mismo, y la mayor mineralización se producen cuando las concentraciones de la hormona aumentan. La caída se produce entre 2 y 4 semanas luego de la disminución anual en la producción de testosterona.). El crecimiento de las astas se vincula también con los cambios estacionales en las concentraciones de melatonina y prolactina [22]. De hecho, el estado de las astas puede ser un buen indicador del estatus reproductivo de los animales, y por tanto de la calidad de semen que se puede colectar en esos machos [23].

Influencias ambientales sobre la calidad seminal: 1. Estímulos sociales

Las señales sociales modulan y producen cambios sobre la actividad reproductiva de otros individuos, pudiendo tanto estimularla como inhibirla (ver revisión: [24]). La

bioestimulación genera consecuencias reproductivas por la presencia de individuos del mismo o del otro sexo: es decir, la presencia continua o súbita de un individuo puede estimular la actividad reproductiva de otro individuo, lo que incluye tanto al "efecto macho" como al "efecto hembra" (ver revisiones: [25,26,27]. Sin embargo, como los efectos son menos claros y el impacto a nivel productivo es menor, el efecto hembra ha sido menos estudiado que el efecto macho, aunque desencadena un aumento en la secreción de LH y como consecuencia de testosterona [28,29]. El contacto súbito con hembras en celo genera un aumento casi inmediato de la concentración de LH y testosterona en carneros [30]. Si además ese efecto se prolonga en el tiempo, aumenta el tamaño

[31] y la firmeza y elasticidad testicular [30] en carneros. Sin embargo, la información disponible sobre los efectos del contacto con hembras sobre las características seminales es muy escasa. Giriboni *et al.* [32] recientemente reportaron que el contacto alambrado por medio de chivos con hembras en celo en forma sostenida a lo largo del año mejora varios indicadores de calidad seminal.

La información en cérvidos es aún más escasa. En el venado de campo, los machos alojados en forma continua con hembras tienen astas más grandes y pesadas, que caen más tarde que las de machos alojados aislados de hembras [33]. Estas astas, cuyo crecimiento depende de la testosterona, también tienen mayor proporción de tejido compacto [34]8, y mayor relación Ca-P en la zona de crecimiento final [34]. En función de ello, Villagrán y Ungerfeld [35] compararon el patrón estacional de testosterona fecal en machos en contacto o aislados de hembras, demostrando que efectivamente el contacto con las hembras induce un aumento en la concentración de dicha hormona. A su vez, estos machos presentaron semen de mejor calidad al comienzo de la estación reproductiva, el que a su vez resistió mejor la adición de un diluyente para su criopreservación.

En varias especies también se reportó que la jerarquía social influye en el estatus reproductivo de los machos. Los individuos que ocupan posiciones más altas en la jerarquía tienen mayor éxito reproductivo que aquellos que ocupan posiciones más bajas [36]. Esto puede estar determinado por varios mecanismos, como la propia agresividad que permite el acceso a mayor número de hembras, lo que podría vincularse con mayores concentraciones de testosterona en los individuos de mayor posición jerárquica [37,38]. En el caso del venado de campo, se reportó que los machos de menor rango jerárquico, y por tanto con menores posibilidades de competir por el acceso a las hembras en celo, eyaculan mayor volumen de semen, lo que les da mayores posibilidades de que su semen compita en el tracto reproductivo de la hembra [39], especialmente considerando el bajo volumen de semen producido en esta especie [40].

Colección de semen en cérvidos

En los animales domésticos la técnica de elección para colectar semen es la vagina artificial, aunque también se puede colectar por electroeyaculación o por masaje transrectal de las ampollas, además de la colección post mortem a partir de la cola del epidídimo [41]. El uso de la vagina artificial permite colectar semen de buena calidad, no provoca estrés ni dolor para

el animal, y se evita la contaminación de la muestra con orina. A su vez, implica entrenar a los animales, y la efectividad de la técnica depende del comportamiento sexual del animal, por lo que en machos de baja líbido, o fuera de la estación reproductiva en especies con reproducción estacional, la colección puede ser menos eficaz. La colección con vagina artificial se utiliza en algunos casos en cérvidos [41,42,43], pero para ello tienen que ser animales muy dóciles, acostumbrados a la presencia humana, y entrenados a saltar y eyacular en la vagina artificial. De todas formas, esto es una maniobra riesgosa en animales con astas, siendo causa de accidentes.

Por ello, la electroeyaculación es el método de elección en animales no domésticos, incluyendo la mayor parte de los cérvidos [44]. Sin embargo, en estas especies es un requisito que el animal este anestesiado para realizar la colecta [45]. La elección del método de captura e inmovilización a utilizar depende de la especie, las condiciones en que se realice el trabajo, el entrenamiento del personal y las facilidades con las que se cuente [45,46,47]. La captura minimiza el riesgo de accidentes, el estrés y dolor de los animales, y los riesgos del personal. Sin embargo, ningún método es inocuo, por lo que el método de captura siempre genera algún grado de estrés, lo que modifica los diferentes parámetros fisiológicos [45,48], y por tanto, también puede influir en la calidad seminal.

Los principales métodos de captura son los físicos y los químicos, y la combinación de ambos. Existen varios métodos de captura físicos, como el uso de trampas, redes, cepos, encierros. Las principales desventajas de estos es que no son selectivos, sino que implican capturar varios animales a la vez; pueden provocar lesiones, tanto en los animales como en los operarios encargados de la captura; y los animales pueden morir por estrés en el momento, o posteriormente por miopatía de captura. A su vez, luego de capturados se pueden administrar tranquilizantes, lo que disminuye las respuestas de estrés [49].

El uso de la inmovilización química es el más frecuente, pero es muy importante conocer en profundidad la farmacología de las diferentes drogas, y como responde la especie, además de que algunas drogas podrían interferir en la propia colecta de semen. En general, las drogas anestésicas se administran mediante dardos disparados desde cerbatanas, o rifles y pistolas de aire comprimido. Esto implica un importante entrenamiento del personal cargo para que los dardos descarguen las drogas en las regiones que facilitan la absorción, como cuello, hombro y grupa.

En venado de campo hemos utilizado una combinación anestésica de ketamina, xilacina y atropina, revirtiendo posteriormente la anestesia con yohimbina [50]. Esto no impide que se desencadenen respuestas indicadoras de estés durante la colecta de semen, como aumentos de frecuencia cardiaca, respiratoria, o aumentos de creatin quinasa. Más aún, estando los animales bajo anestesia general, la aplicación de los pulsos eléctricos desencadena la emisión de vocalizaciones [51], respuesta vinculada con el estrés y probablemente dolor durante la electroeyaculación (ver revisión: [52]. Por ello en algunos trabajos hemos comparado agonistas α-2 adrenérgicos sustituyendo la xilacina (detomidina, medetomidina), pero los resultados han sido similares. La administración de analgésicos por vía epidural disminuye las respuestas identificadas con dolor, incluyendo una disminución de los cambios inducidos por los pulsos eléctricos en la actividad eléctrica cortical.

La recogida de espermatozoides epididimarios post-mortem permite la preservación de material genético de animales muertos de forma natural o por actividades cinegéticas. Los métodos de colecta incluyen el método de cortes del conducto epididimario, o el arrastre de los espermatozoides desde el conducto deferente, ya sea por presión de aire o por *flushing* con un medio líquido diluyente [53,54]. Mediante esta técnica se han obtenido espermatozoides de buena calidad tanto para estudios de estacionalidad reproductiva como para su criopreservación en el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) [55], gamo (*Dama dama*) [54] y corzo (*Capreolus capreolus*) [55]. El tiempo transcurrido desde la muerte del animal hasta la obtención de las muestras espermáticas influye negativamente sobre la calidad espermática y sobre la capacidad fecundante de las muestras obtenidas del epidídimo de ciervos muertos [56]. Así, los valores de calidad seminal obtenidos a partir de las 12 horas de la muerte de los animales son significativamente inferiores para los parámetros de movilidad, viabilidad, integridad morfológica y capacidad fecundante.

Características del semen

Existe una gran variabilidad en los parámetros seminales entre las diferentes especies de cérvidos [57], así como entre los machos de una misma especie [58]. En forma general, las especies de menor tamaño corporal producen menor volumen de eyaculado [59] que las especies de mayor tamaño corporal [60]. Sin embargo, la concentración espermática y el total de espermatozoides en el eyaculado parecería no estar relacionado con el tamaño corporal [61]. Los parámetros del espermiograma varían mucho entre los machos y las colecciones, lo que puede estar relacionado con las condiciones en que se colectaron las muestras seminales: animales que se encontraban estresados, ya que fueron capturados con dardos anestésicos, mantenidos bajo anestesia general, además de que se les realizó electroeyaculación. Dichos procedimientos pueden producir una amplia variabilidad en las características del semen [62], además de ser muy estresantes para los animales [50]. Otros factores, como el periodo del año en que se recogen las muestras o los métodos de colecta (ej. electroeyaculación, epididimario postmortem) van a determinar variaciones en las características seminales [55].

En el venado de campo, una especie de interés en conservación en la región, las características del semen colectado fueron sensiblemente inferiores a las reportadas en otros pequeños rumiantes [40]. El volumen del eyaculado es de aproximadamente 0,5 mL, con una concentración de alrededor de 400 x 10^6. El porcentaje de espermatozoides mótiles es de alrededor de 70%, y de espermatozoides con motilidad progresiva de 60%. Alrededor del 60% de los espermatozoides presentaban algún tipo de anormalidad. Los bajos valores obtenidos de concentración y volumen son una fuerte limitante para utilizar las muestras obtenidas para su criopreservación. Un aspecto interesante es que la longitud de la cabeza de los espermatozoides tiene una relación positiva con la calidad de la motilidad, con el porcentaje de espermatozoides mótiles, y con el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. A su vez, el área de la cabeza y el perímetro mostraron una relación positiva con la calidad de la motilidad. En el mismo sentido, Malo *et al.* [63] y Ramón *et al.* [64] encontraron una relación positiva entre la longitud de la cabeza y la velocidad de los espermatozoides de

ciervo rojo: aquellos espermatozoides con cabezas alargadas poseen una mayor velocidad en su motilidad. Esta información podría ser útil para elegir los mejores machos desde el punto de vista seminal, y mejorar el uso de biotecnologías reproductivas.

La dimensión de la cabeza del espermatozoide ha sido considerada un factor determinante de la congelabilidad espermática. Cabezas más pequeñas serían menos sensibles al intercambio de agua entre la célula y el medio extracelular que acontece durante los procesos de congelación y descongelación y, por tanto, más resistentes al daño osmótico [65]. No obstante, estudios recientes incluyendo una gran cantidad de especies con diferentes características morfométricas de la cabeza espermática, cuestionan la preponderancia de este factor y consideran otros factores, como la composición de la membrana celular, más determinantes de la criorresistencia espermática [66]. De hecho, cuando se comparan las dimensiones de cabeza espermática entre distintas especies de cérvidos se observa que el área de la cabeza de espermatozoides epididimarios son más pequeñas en el gamo (29 μm^2; [54]) que en el corzo (30 μm^2, [55]) y el ciervo rojo ibérico (32 μm^2, [65]), siendo peor la criorresistencia en los espermatozoides de corzo respecto a las otras dos especies de cérvidos. No es descartable una cierta influencia de la dimensión del cabeza en la criorresistencia, pero a un nivel de subpoblaciones espermáticas. En estas especies se ha apuntado la existencia de 3-4 subpoblaciones espermáticas de acuerdo a sus características morfométricas. La existencia de subpoblaciones espermáticas reafirma la idea de la heterogeneidad existente en los eyaculados de los mamíferos, mostrando diferentes respuestas hacia estímulos bioquímicos, funcionales [67], diferentes patrones de motilidad [68,69], e incluso con diferentes parámetros morfométricos [70,71]. El estudio de subpoblaciones de espermatozoides en un eyaculado podría ser una herramienta práctica para predecir la resistencia de los espermatozoides a los procesos de criopreservación [68,69], considerando la posible relación negativa entre el tamaño de la cabeza de los espermatozoides y la preservación de los mismos [65,70,71].

Criopreservación del semen

La criopreservación de espermatozoides tiene un interés tanto desde el punto de vista de la conservación de especies de cérvidos amenazadas, como para uso del material criopreservado en programas de mejora genética en granjas de cérvidos con fines cinegéticos, de producción de carne, o de otras producciones alternativas. Desde el descubrimiento del papel crioprotector del glicerol [72] han sido numerosos los avances en la criobiología. Los espermatozoides representan el tipo celular en el que se ha centrado gran parte de la investigación para el desarrollo de bancos de germoplasma, dado la mayor facilidad de obtención respecto a otras células o a los embriones, y la posibilidad de uso mediante técnicas de reproducción asistida, como la inseminación artificial. Los procedimientos de criopreservación se orientan a intentar minimizar los daños celulares que se producen durante la congelación y descongelación celular. Estos incluyen, principalmente, daños a nivel de la membrana plasmática (ej. rotura de la membrana, desnaturalización y desplazamiento de las proteínas de membrana), membrana mitocondrial y acrosoma [73]. Igualmente, los procesos de congelación-descongelación determinan una desestructuración de los microtúbulos

que conforman el flagelo del espermatozoide. Las alteraciones de la membrana y de los microtúbulos están determinadas por el daño osmótico que se produce durante el proceso de congelación-descongelación. El estrés osmótico también determina variaciones en las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide [66]. Por otro lado, la producción de especies de oxígeno reactivo, generados principalmente a nivel mitocondrial durante la criopreservación, va a determinar la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana del espermatozoide. Estos radicales libres van a propiciar, a su vez, el desencadenamiento de procesos apoptóticos que se reflejan alteración del potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi m$), fragmentación del ADN, inversión en la membrana de la fosfatidilserina y activación de caspasas [74] (Martínez-Pastor *et al.*, 2008). Las caspasas activan endonucleasas citoplasmáticos que degradan material nuclear y proteasas que degradan proteínas nucleares y citoesqueletos (ej. microtúbulos flagelares). Este conjunto de alteraciones celulares merma la viabilidad, actividad cinética y la capacidad fecundante de los espermatozoides criopreservados. La optimización de los procesos de criopreservación intenta reducir estas alteraciones del espermatozoide mediante la optimización de las rampas de enfriamiento, crioprotectores permeables, y exploración de nuevos aditivos en los diluyentes de congelación.

Las rampas de congelación suponen uno de los elementos claves para conseguir una criopreservación exitosa de los espermatozoides [75], ya que de ellas dependen las características y formas de los cristales de hielo, principalmente extracelulares, que son una de las principales causas de daño celular durante el proceso de congelación. Las alteraciones celulares durante la criopreservación son debidas, principalmente, a daños osmóticos relacionados con las trabéculas entre cristales donde se concentras los solutos que se excluyen del cristal de hielo durante la congelación, y donde se disponen los espermatozoides, que responden perdiendo agua (deshidratación celular) para equilibrase osmóticamente con este medio externo hiperosmótico; las características de estas trabéculas y las concentración de dichos solutos son dependientes de las características y tamaños de los cristales de hielo; velocidades más altas de enfriamiento determinan cristales de tamaño más pequeño [73]. En cérvidos, habitualmente se emplean rampas de congelación lenta, mediante vapores de nitrógeno líquido tras periodos de equilibrado con el crioprotector que oscilan entre las 2-3 horas [65,74]. Dado que muchos de los trabajos se realizan en condiciones de campo, muchas veces es muy poco práctico y bastante engorroso aplicar las técnicas de congelación tradicionales, incluyendo curvas de enfriado largas que pueden dificultar su implementación. Por eso recientemente comenzaron a utilizarse técnicas de congelación ultrarápida [73], pero con las que hasta el momento en los cérvidos no se ha logrado la misma efectividad que con las técnicas tradicionales, a diferencia de lo logrado en otras especies [54,55]. La congelación ultrarrápida se realiza por inmersión directa de los espermatozoides diluidos (diluyente a base de Tris, ácido cítrico, glucosa y sucrosa) en gotas de 50 µL directamente en nitrógeno líquido, que permite una velocidad de enfriamiento >2000ºC/min.

Para la criopreservación de células espermáticas de los cérvidos se han evaluado distintos diluyentes, con diferentes aditivos en su composición. La yema de huevo representa uno de los aditivos que aporta mayores beneficios para la congelación espermática, ya que

protege a la célula del shock frío y confiere una cierta protección durante el proceso de congelación- descongelación. Entre otras acciones, la yema de huevo previene la pérdida de colesterol y fosfolípidos de la membrana espermática mediante captación de las proteínas BSP del plasma seminal, disminuyendo su cantidad disponible para unirse a la membrana y por tanto amortiguando su efecto deletéreo en la salida del colesterol y fosfolípidos [76]. No obstante, en algunas especies las concentraciones altas de yema de huevo pueden generar efectos adversos en el espermatozoide, principalmente a nivel del acrosoma. En el ciervo rojo se suele emplear la yema de huevo a una concentración (vol:vol) de 20% [75], en el corzo al 6-16% [77], mientras que en el gamo de usa al 12% [54]. Teniendo en cuenta que el estrés oxidativo es el responsable, en parte, de la muerte y pérdida de funcionalidad de los espermatozoides durante la congelación, se ha evaluado también el efecto de la adición de distintos antioxidantes al diluyente de congelación sobre la congelabilidad espermática. Un estudio realizado con muestras espermáticas epididimarias de ciervo ibérico demostró que la adición de antioxidantes enzimáticos, al medio de congelación, mejoraba la mayoría de los parámetros espermáticos tras la descongelación. Sin embargo, no se encontraron efectos beneficiosos de los antioxidantes no enzimáticos [78].

Consideraciones finales

Cómo se mencionó, los cérvidos son un grupo de especies heterogéneas que no presentan un único patrón reproductivo. Su evolución en diferentes hábitats y condiciones ha llevado a una importante diversidad de su biología reproductiva, lo que hace difícil poder referirse a una única estrategia para el manejo reproductivo en los cérvidos. Es fundamental conocer en profundidad la biología reproductiva de cada especie para desarrollar estrategias específicas, cosa que solamente se ha hecho en pocas especies, en las que los ejemplares son abundantes, y se incluyen en sistemas productivos. Sin embargo, los resultados obtenidos en estas especies no son linealmente trasladables a otras, lo que implica un avance lento en el conocimiento y aplicación de biotecnologías reproductivas en estas especies.

Uno de los principales hándicaps a superar en el contexto de la criobiología de espermatozoides de cérvidos es la obtención de buenas tasas de fertilidad con el uso de semen congelado, mediante inseminación artificial. En algunas especies, como el ciervo rojo, el uso de la inseminación artificial con semen congelado se ha instaurado de forma rutinaria en algunas granjas de ciervos. Cuando se emplea la inseminación artificial exocervical, la tasa de fertilidad media se encuentra en alrededor de un 30% [79]. Cuando el material espermático congelado- descongelado se aplica mediante inseminación artificial laparoscópica, los resultados de fertilidad llegan a ser bastante más satisfactorios, del orden de un 61-65% en ciervo rojo ibérico [80,81], y del 65-714% en gamo [82]. No obstante, la elevada variabilidad individual en la respuesta a la congelación en el ciervo rojo y gamo determina que se deba realizar un esfuerzo en la identificación de marcadores de congelabilidad espermática. En otras especies menos estudiadas, las tasas de fertilidad son bajas o bien no se han llegado a realizar ningún estudio a este respecto [82], por lo que la optimización de diluyentes, aditivos y rampas de congelación debe seguir siendo una prioridad.

Otras líneas actuales de investigación en cérvidos están relacionadas con el uso de las tecnologías de fecundación *in vitro*, con gametos obtenidos de animales muertos, con el fin de aprovechar también el material genético de las hembras, habiéndose obtenido tasas aceptables de formación de blastocistos [83]. Por otro lado, la separación der espermatozoides X e Y, previa a la inseminación artificial, se presenta como una técnica de gran interés cuando va dirigida a la obtención de animales de alto valor económico y/o genético [84].

Referencias bibliográficas

[1] Nowak RM. Walker's Mammals of the World. Vol 2. 6th ed. John Hopkins Univ. Press: Baltimore, MD, 1999.

[2] Hackmann TJ, Spain JN. Invited review: Ruminant ecology and evolution: Perspectives useful to ruminant livestock research and production. J Dairy Sci 2010;93:1320-1334.

[3] Van Wieren SE. Digestive strategies in ruminants and non-ruminants. Landbouwuniversiteit Wageningen, 1996.

[4] Flach E. Cervidae and Tragulidae. En: Zoo and wild animal medicine, Fowler M. (Ed). Philadelphia, EEUU, p. 634-649, 2003.

[5] Deer Industry New Zealand, http://www.deernz.org/. Accedido el 22 de febrero de 2021.

[6] Lincoln GA, Short RV. Seasonal breeding: Nature's contraceptive. Recent Prog Horm Res 1980;36:1-52.

[7] Bronson FH. Mammalian reproductive biology. The University of Chicago Press, Chicago, 1989.

[8] Swierstra EE, Foote RH. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. Am J Anat 1965; 116:401-411.

[9] English A. Management strategies for farmed chital deer. En: Brown RD (Ed), The biology of deer. Springler-Verlag, NY, p. 189-196, 1992.

[10] Mylrea GE, English AW, Mulley RC, Evans G. Artificial insemination of farmed chital deer. In: Brown RD (Ed), The biology of deer. Springler-Verlag, NY, p. 334-337, 1992.

[11] Bubenik GA, Brown RD, Schams D. Antler cycle and endocrine parameters in male axis deer (Axis axis): Seasonal levels of LH, FSH, testosterone, and prolactin and results of GnRH and ACTH challenge tests. Comp Bioch Physiol Part A: Physiol 1991; 99:645–650.

[12] Loudon ASI, Curlewis JD. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (Axis axis). J Reprod Fert 1988; 83:729-738.

[13] Zerbe P, Clauss M, Cordon D, Bingaman Lackey L, Rensch E, Streich JW, Hatt JM, Müller DWH. Reproductiive seasonality in captive wild ruminants: implications for biogeographical adaptation, photoperiodic control, and life history. Biol Rev 2012; 87:965-990.

[14] Lincoln GA, Guinness F, Short RV. The way in which testosterone controls the social and sexual behavior of the red deer stag (*Cervus elaphus*). Horm Behav 1972; 3:375-396.

[15] Clutton-Brock T, Guinness FE, Albon SD. Red beer: behavior and ecology of two sexes. Chicago, Ed. University of Chicago, 1982.

[16] Ebling FJ. The response of the cutaneous glands to steroids. Gen Comp Endocr Suppl 1972; 3:228-237.

[17] Gaspar-Lopez E, Landete-Castillejos T, Estevez JA, Ceacero F, Gallego L, García AJ. Biometrics, testosterone, cortisol and antler growth cycle in iberian red deer stags (*Cervus elaphus hispanicus*). Reprod Dom Anim 2010; 45:243-249.

[18] Haigh JC, Cates WF, Glover GJ, Rawlingst NC. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapití (Cervus elaphus). J Reprod Fert 1984; 70:413-418.

[19] Reyes E, Bubenik GA, Schams D, Lobos, A, Enriquez R. Seasonal changes of testicular parameters in southern pudu Pudu pudu in relationship to circannual variation of its reproductive hormones. Acta Theriol 1997; 42:25-35.

[20] Bubenik GA, Bubenik AB. Seasonal variations in hair pigmentation of white-tailed deer and their relationship to sexual activity and plasma testosterone. J Exp Zool 1985; 235:387-395.

[21] Bubenik GA. Regulatory mechanisms of the antler cycle and the selection of deer breeding stock by endocrine tests. En: Wildlife Production-Conservation and Sustainable Development. Renecker LA, Hudson RJ (Eds). AFES Misc. Publ., p. 91-6. Univ. of Alaska. Fairbanks. AK. EEUU, p. 521-529, 1991.

[22] Bubenik GA. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle- a review. Veterinarski Arhiv 2006; 76:275-285.

[23] Malo AF, Roldan ERS, Garde J, Soler AJ, Gomendio M. Antlers honestly advertise sperm production and quality. Proc R Soc B 2005; 272:149-157.

[24] Ungerfeld R. Socio-sexual signaling and gonadal function: opportunities for reproductive management in domestic ruminants. Soc Reprod Fertil Suppl 2007; 64:207-221.

[25] Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. J Reprod Fertil Suppl 1999; 52:243-257.

[26] Martin GB, Milton JTB, Davidson RH, Banchero Hunzicker GE, Lindsay DR, Blache D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. Anim Reprod Sci 2004; 82:231-245.

[27] Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. The "male effect" in sheep and goats - Revisiting the dogmas. Behav Brain Res 2009; 200:304-314.

[28] Gonzalez R, Poindron P, Signoret JP. Temporal variation in LH and testosterone responses of rams after the introduction of oestrous females during the breeding season. J Reprod Fertil 1988; 82:201-208.

[29] Walkden-Brown SW, Restall BJ, Norton BW, Scaramuzzi RJ. The "female effect" in Australian cashmere goats: effect of season and quality diet on the LH and testosterone response of bucks to oestrous does. J Reprod Fertil 1994; 100:521-531.

[30] Ungerfeld R, Silva L. Ewe effect: endocrine and testicular changes in experienced adult and inexperienced young Corriedale rams used for the ram effect. Anim Reprod Sci 2004; 80:251- 259.

[31] Illius AW, Haynes NB, Lamming GE. Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behaviour in the ram. J Reprod Fertil 1976; 48:25-32.

[32] Giriboni J, Lacuesta L, Ungerfeld R. Continuous contact with females in estrus throughout the year enhances testicular activity and improves seminal traits of male goats. Theriogenology 2017; 87:284-289.

[33] Ungerfeld R, Damián JP, Villagrán M, González-Pensado SX. Female effect on antlers of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Can J Zool 2009; 87:734-739.

[34] Ceacero F, Villagrán M, Gambín-Pozo P, García AJ, Cappelli J, Ungerfeld R. Better antlers when surrounded by females? The social context influence antler mineralization in pampas deer (*Ozotozeros bezoarticus*) Ethol Ecol Evol 2019; 31:358-368.

[35] Ungerfeld R, Canabal M. Internal architecture of pampas deer antlers differs in males allocated with and without females. Acta Theriol 2014; 59:347-351.

[36] Villagrán M, Ungerfeld R. Permanent contact with females increases testosterone and improves fresh semen traits in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. Anim Reprod Sci; 2013;143:85-90.

[37] McElligott AG, Gammell MP, Harty HC, Paini DR, Murphy DT, Walsh JT, Hayden TJ. Sexual size dimorphism in fallow deer (*Dama dama*): do larger, heavier males gain greater mating success? Behav Ecol Sociobiol 2001; 49:266-272.

[38] Bartoš L, Reyes E, Schams D, Bubenik G, Lobos A. Rank dependent seasonal levels of IGF- 1, cortisol and reproductive hormones in male pudu (*Pudu pudu*). Comp Biochem Physiol Part A: Mol & Int Physiol 1998; 120:373-378.

[39] Bartoš L, Schams D, Bubenik GA, Kotrba R, Tománek M. Relationship between rank and plasma testosterone and cortisol in red deer males (*Cervus elaphus*). Physiol Behav 2010; 101:628-634.

[40] Villagrán M, Beracochea F, Bartoš L, Ungerfeld R. Hierarchical status and body traits and reproductive characteristics of male pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) maintained in all- male groups. Appl Anim Behav Sci 2018; 207:116-122.

[41] Beracochea F, Gil J, Sestelo A, Garde JJ, Santiago-Moreno J, Fumagalli F, Ungerfeld R. Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Anim Reprod Sci 2014; 149:224-230.

[42] Durrant BS. The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species). Theriogenology 2009; 71:113-122.

[43] Cortes S, Santiago-Moreno J, Gonzaelz-Bulnes A. Recogida de semen de muflón (Ovis gmelini musimon) mediante vagina artificial. Trofeo 1996; 1317:34-36.

[44] Gizejewski Z. Effect of season on characteristics of red deer (Cervus elaphus) semen collected using modified artificial vagina. Reprod Biol 2004; 4:51-66.

[45] Santiago-Moreno J, Coloma MA, Toledano-Díaz A, Gómez-Brunet A, Pulido-Pastor A, López-Sebastián A. Métodos de estudio de la actividad reproductiva en ungulados de interés cinegético. En: Ungulados silvestres de España: biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético. (Ed). INIA, Madrid, España. p. 53-55, 2010.

[46] Montané J, Marco I, López J. Manteca X, Lavín S. Captura y manejo postcaptura del corzo (Capreolus capreolus). Med Vet 2001; 18:341-351.

[47] Flach E. Cervidae and Tragulidae. En: Zoo and Wild Animal Medicine, Fowler M. (Ed). Philadelphia, EEUU. p. 634-649, 2003.

[48] Seal US, Bush M. Capture and chemical immobilization of cervids. En: Biology and Management of the Cervidae, Wemmer CM. (Ed). Smithsonian Institution, Washington. p. 480- 504, 1987.

[49] Casas-Díaz E, Marco I, López-Olvera JR, Mentaberre G, Lavín S. Use of acepromazine for stress control in spanish ibex (*Capra pyrenaica*) captured by drive-net. Vet J 2010; 183:332-336.

[50] Fumagalli F, Villagrán M, Damián JP, Ungerfeld R, Physiological and biochemical parameters in response to electroejaculation in adult and yearling anesthetized pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. Reprod Dom Anim 2012; 47:308-312.

[51] Fumagalli F, Damián JP, Ungerfeld R. Vocalizations during electroejaculation in anesthetized adult and young pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) males. Reprod Dom Anim 2015; 50:321- 326.

[52] Abril-Sánchez S, Freitas-de-Melo A, Giriboni J, Santiago-Moreno J, Ungerfeld R. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. Anim Reprod Sci 2019; 205:1-9.

[53] Soler AJ, Perez-Guzman MD, Garde JJ. Storage of red deer epididymides for four days at 5ºC: Effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. J Exp Zool 2002; 295A:188- 199.

[54] Bóveda P, Esteso MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Muñiz A, Prieto P, Mejía O, Ungerfeld R, Santiago-Moreno J. Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving mouflon (*Ovis musimon*) and fallow deer *(Dama dama*) epididymal sperm. Anim Reprod Sci 2018; 192:193-199.

[55] Santiago-Moreno J, Castaño C, Bóveda P, Mejía O, Velázquez R, Martínez-Fresneda L, Flores-Gil VN, Marcos-Beltrán JL, González-Guirado AM, Esteso MC, Toledano-Díaz A, López- Sebastián A. Slow and ultra-rapid freezing protocols for cryopreserving roe deer (Capreolus capreolus) epididymal sperm collected at different times of year. Eur J Wildl Res 2021; 67:24.

[56] Soler AJ, Garde JJ. Relationship between the characteristics of epididymal red deer spermatozoa and penetrability into zona-free hamster ova. J Androl 2003; 24:393-400.

[57] Drion PV, Hanzen C, Wirth D, Beckers JF, Leboeuf B, Ropstad E, Balligand M, Bauvir E, Gabriela A, Collin B. Physiologie de la reproduction et endocrinologie chez les cervidés: une revue. Ann Méd Vét 2003; 147:291-213.

[58] Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim Reprod Sci 2008; 104:359-369.

[59] Santymire RM, Marinari PE, Kreeger JS, Wildt DE, Howard JG. Sperm viability in the blanck- footed ferret (*Mustela nigripes*) is influenced by seminal and medium osmolality. Cryobiology 2006; 53:37-50.

[60] Kiso WK, Brown JL, Siewerdt F, Schmitt DL, Olson D, Crichton EG, Pukazhenthi BS. Liquid semen storage in elephants (*Elephas maximus* and *Loxodonta africana*): species differences and storage optimization. J Androl 2011; 32:420-431.

[61] Comizzoli P, Songsasen N, Hagedorn M, Wildt DE, Comparative cryobiological traits and requirements for gametes and gonadal tissues collected from wildlife species. Theriogenology 2012; 78:1666-1681.

[62] Memon MA, Bretzlaff KN, Ott RS. Comparision of semen collection techiques in goats. Theriogenology 1986; 26:823-827.

[63] Malo AF, Gomendio M, Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ERS. Sperm design and sperm function. Biol Lett 2006; 2:246-249.

[64] Ramón M, Soler AJ, Ortiz JA, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Roldan ERS, Garde JJ. Sperm population structure and male fertility: an intraspecific study of sperm design and velocity en red deer. Biol Reprod 2013; 89:110-117.

[65] Esteso MC, Fernández-Santos R, Soler AJ, Quintero-Moreno A, Garde JJ. Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal sperm samples. J Androl 2006; 27:663-670.

[66] O'Brien E, Esteso MC, Castaño C, Toledano-Díaz A, Bóveda P, Martínez-Fresneda L, López- Sebastián A, Martínez-Nevado E, Guerra R, López Fernández M, Vega RS, Guillamón FG, Santiago-Moreno J. Effectiveness of ultra-rapid cryopreservation of sperm from endangered species, examined by morphometric means. Theriogenology 2019; 129:160-167.

[67] Martínez-Pastor F, García-Macias V, Alvarez M, Herraez P, Anel L, de Paz P. Sperm subpopulations in Iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. Biol Reprod 2005; 72:316-327.

[68] Quintero-Moreno, A, Miró J, Rigau AT, Rodríguez-Gil JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. Theriogenology 2003; 59: 1973-1990.

[69] Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. Two-step cluster procedure after principal component analysis identifies sperm subpopulations in canine ejaculates and its relation to cryoresistance. J Androl 2006; 27:596-603.

[70] Thurston LM, Watson PF, Holt WV. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. J Reprod Fertil 1999; 117:271- 280.

[71] Peña FJ, Saravia F, García-Herreros M, Núñez-Martínez I, Tapia JA, Johannison A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. Identification of sperm morphometric subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. J Androl 2005; 26:716-723.

[72] Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949; 164:666.

[73] Bóveda P, Toledano-Díaz A, Castaño C, Esteso MC, López-Sebastián A, Rizos D, Bielli A, Ungerfeld R, Santiago-Moreno J. Ultra-rapid cooling of ibex sperm by spheres method does not induce a vitreous extracellular state and increases the membrane damages. PLoS One 2020; 15:e0227946.

[74] Martínez-Pastor F, Aisen E, Fernández-Santos MR, Esteso MC, Maroto-Morales A, García- Alvarez O, Garde JJ. Reactive oxygen species generators affect quality parameters and apoptosis markers differently in red deer spermatozoa. Reproduction 2009; 137:225-235.

[75] Fernández-Santos MR, Esteso MC, Soler AJ, Montoro V, Garde JJ. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. Reprod Domest Anim 2006; 41:114-118.

[76] Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., Ménard, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. Biol Reprod 2002; 67:1250-1258.

[77] Prieto Pablos MT, Sánchez-Calabuig MJ, Hildebrandt TB, Göritz F, Ortmann S, Eder S, Santiago-Moreno J, Hermes R, Saragusty J. Cryopreservation of captive roe deer (*Capreolus capreolus*) semen. Theriogenology 2016; 86:695-703.

[78] Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Esteso MC, Soler AJ, De Paz P, Anel L, Garde JJ. Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. J Androl 2007; 28:294-305.

[79] Garde JJ, Martínez-Pastor F, Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernández-Santos MR, Esteso MC, García AJ, Anel L, Roldan ERS. The application of reproductive technologies to natural populations of red deer. Reprod Dom Anim 2006; 41:93-112.

[80] Soler AJ, García AJ, Fernández-Santos MR, Esteso MC, Garde JJ, 2003. Effects of thawing procedure on post-thawed *in vitro* viability and in vivo fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 ºC. J Androl 2003; 24:746-756.

[81] Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, García AJ, Gomendio M, Roldan ERS. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. Biol Reprod 2005; 72:822-829.

[82] Asher G, Berg D, Evans G, Salamon S, Maxwell W. Storage of semen and artificial insemination in deer. Anim Reprod Sci 2000; 62:195-211.

[83] García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Berlinguer F, Fernández-Santo MR, Esteso MC, Mermillod P, Ortiz JA, Ramon M, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ, Soler AJ. Effect of storage temperature during transport of ovaries on *in vitro* embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Theriogenology 2011; 75:65-72.

[84] Anel-Lopez L, Garcia-Alvarez O, Maroto-Morales A, Tarantini T, Del Olmo D, Ortiz JA, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Garde JJ, Parrilla I Optimization of protocols for Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) sperm handling before sex sorting by flow cytometry. Theriogenology 2017; 92:129e136.

Perfil endócrino como ferramenta auxiliar na avaliação reprodutiva de animais domésticos

Maria Inês Lenz Souza
maria.souza@ufms.br
Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Abstract: Testicular function and male reproductive activity depends on endocrine, paracrine and autocrine hormonal and humoral complex mechanisms interactions. This complex interactions makes difficult to elucidate physiological moments linked to reproduction and reproductive dysfunctions with hormonal involvement through simply endocrine profile measuring. The testicular cells interaction with each other and with other organism tissues, through chemical communication, involves several hormones and intra and extragonadals growth factors to produce germ cells on reproductive lifelong, including the beginning of male puberty and this environment adaptation in seasonal animals. The male reproductive physiology knowledge, specifically the neuroendocrine control, with different species particularities and many phases of animal's life is very important to understand the functions of reproductive hormones. The knowledge of each situation studied allows the determination of specific protocols for evaluation, manipulation and reproductive treatments.

Keywords: hormones, males, physiology.

Palavras-chave: hormônios, machos, fisiologia.

Introdução

O controle da função testicular e, em consequência, da atividade reprodutiva masculina, envolve complexos mecanismos endócrinos, parácrinos e autócrinos, os quais podem dificultar a elucidação de alterações reprodutivas com envolvimento hormonal [1;2] e a utilização de perfis endócrinos na avaliação de diferentes fases relacionadas à reprodução. O conhecimento básico destes mecanismos e interações permite identificar possíveis falhas e, de forma mais importante, fornecer substratos para sustentar manipulações que engrandeçam ou antecipem os mesmos. Os esteroides sexuais, mais utilizados como marcadores de função reprodutiva, regulam fases críticas de desenvolvimento e são essenciais para a homeostase de funções fisiológicas fundamentais [3].

No controle das funções do organismo existem três eixos endócrinos maiores, com organização hierárquica similar centrada no hipotálamo, decisivos para a sobrevivência das espécies. São eles: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (H-H-A), com papel crucial na adaptação ao estresse; o eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (H-H-G), responsável pela reprodução; e o eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (H-H-T), regulador-chave do metabolismo e da homeostase de energia, fundamentais para todas as funções corporais [4]. Estes eixos

se refletem, direta ou indiretamente, no potencial produtivo e reprodutivo dos animais e nas respostas das diferentes substâncias químicas circulantes no organismo.

Os testículos são complexos órgãos endócrinos, nos quais diferentes tipos celulares inter-relacionam-se com o objetivo de produzir as células germinativas, sob o controle de vários hormônios e fatores de crescimento intra e extragonadais [5;6], fornecendo um ambiente químico adequado para cada fase da espermatogênese.

Os diferentes testes laboratoriais disponíveis medem as condições fisiológicas em que se encontra um determinado indivíduo no momento da colheita do material, mas existem condições nas quais os resultados obtidos não se enquadram nos limites definidos como normais, ainda que isso não represente uma condição patológica [7]. Os resultados destes testes, avaliados para cada situação específica do animal examinado, podem ajudar no conhecimento de sua fisiologia reprodutiva masculina. A disfunção endócrina nos machos pode ser investigada através dos perfis endócrinos relacionados aos eixos hormonais androgênicos [8], decorrentes do eixo H-H-G [9]. Em humanos, as disfunções endócrinas primárias representam menos de 3% das causas de infertilidade, mas 30-70% dos homens inférteis tem algum grau de disfunção endócrina concorrente [8]. Nos animais de produção, estas alterações também ocorrem, mas as informações não são tão precisas, e a variabilidade de espécies, raças e linhagens, além da fase reprodutiva em que o animal se encontra e do manejo a que é submetido, dificultam o diagnóstico.

O conhecimento da fisiologia reprodutiva dos machos, com as particularidades das diferentes espécies e fases da vida é de fundamental importância para a compreensão dos perfis endócrinos relacionados a ela, permitindo estabelecer protocolos de avaliação, manipulação e tratamentos reprodutivos para cada situação estudada, e esse tema é discutido nos tópicos a seguir.

Controle neuroendócrino da reprodução em machos

O controle da função reprodutiva masculina está centrado no eixo hipotálamo-hipófise- testículos (H-H-T), pois a função testicular normal requer estímulo hormonal pelas gonadotrofinas hipofisárias (hormônio folículo estimulante - FSH e hormônio luteinizante - LH), as quais, por sua vez, são controladas pela secreção pulsátil hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH, via estímulo de neurônios kisspeptina [2;4;10; 11; 12; 13]. A hipófise adapta, dinamicamente, suas respostas coordenadas aos comandos hipotalâmicos para gerar pulsos endócrinos complexos [9; 14], conforme os momentos fisiológicos em que o animal se encontra, durante o seu desenvolvimento e vida adulta, e as modificações de manejos a que ele é submetido.

No entanto, vários sistemas hormonais e humorais inter-relacionam-se, direta e indiretamente, com este eixo, em algum momento do desenvolvimento, e podem modificar a sua função e as respostas das células testiculares [2; 8;15; 16; 17; 18; 19], além das várias substâncias peptídicas e proteicas produzidas por estas células [10; 11] e também oriundas do metabolismo animal [19].

A rede de células endócrinas apresenta marcante plasticidade na dependência do estado fisiológico [14], como na puberdade e na estação reprodutiva em animais estacionais [1], o que faz com que ela se modifique em resposta às condições de manejo e ambiente.

Os gonatrofos hipofisários são histologicamente organizados em forma de fios e tem sua motilidade induzida pelo GnRH, com formação de projeções aos vasos sanguíneos, através da presença de capilares fenestrados entrelaçados às células endócrinas, que regulam o acesso de moléculas e adaptam, dinamicamente, o suprimento sanguíneo à demanda metabólica, assim contribuindo com a geração dos pulsos endócrinos e com a plasticidade [14].

Nos testículos, ainda que com variações nas respostas entre as espécies, o FSH atua nas células de Sertoli, estimulando a espermatogênese, bem como a síntese e secreção de estrógenos, inibina e ativina, entre outras substâncias, enquanto o LH age nas células de Leydig, desencadeando a esteroidogênese, principalmente com a produção de andrógenos, resultando em pulsatilidade de testosterona seguindo o modelo de secreção do LH [1; 6; 8; 10; 11]. A síntese de estrógeno no testículo ocorre nas células de Sertoli durante o desenvolvimento e nas células de Leydig na vida adulta, na maioria das espécies [9; 20]. Estes dois tipos celulares são intrinsecamente conectados para garantir a função testicular completa, desde a fase pós-natal [21; 22]. Assim, os andrógenos são secretados para o sangue e, também, se difundem dentro das células de Sertoli adjacentes, com suas concentrações dose- dependentes da frequência de pulsos de GnRH/LH [9; 18], estimulando a espermatogênese e a secreção de peptídeos e proteínas, como ativina, inibina, folistatina, proteína de união aos andrógenos - ABP e fator de crescimento semelhante à insulina – IGF-1, entre outros, além da conversão de testosterona à di-hidrotestosterona - DHT [6; 9; 11].

O FSH é crítico para o desenvolvimento e proliferação das células de Sertoli antes da puberdade, enquanto sua associação com a testosterona ativa diferenciação e maturação dessas células, necessárias para a expressão de genes de fatores parácrinos importantes para o desenvolvimento das células germinativas [1; 3; 10;19; 22].

O desenvolvimento gonadal tem início na vida fetal e é continuado até a fase peripuberdade. Em bovinos, altas concentrações de gonadotrofinas séricas e de seus receptores testiculares são críticas para iniciar o rápido crescimento pós-natal dos testículos, com a androstenediona como andrógeno dominante, mantendo-o, após 25 semanas de idade, em condições de baixas concentrações circulantes de gonadotrofinas e altas de testosterona, devido à elevada quantidade de receptores nas células de Sertoli e de Leydig [21; 22; 23]. A transição de secreção predominante de androstenediona da fase pré-puberdade para testosterona (com, no mínimo, 1 ng/mL) é crucial para o desenvolvimento gonadal relacionado à função das células de Leydig e de Sertoli [22].

A partir da liberação dos andrógenos na corrente sanguínea, se estabelecem alças de feedback negativo entre testículos, hipotálamo e hipófise anterior, resultando na regulação da secreção de GnRH/kisspeptina e gonadotrofinas, principalmente por afetar a liberação de opioides endógenos e, também, pela intensidade de ação da enzima aromatase que converte a testosterona em estradiol, prolongando este feedback negativo [1; 10; 18; 20; 24]. A inten-

sidade do feedback negativo sobre o hipotálamo depende das concentrações circulantes de testosterona, variáveis entre as diferentes espécies; se estiverem altas, inibem a liberação de GnRH, FSH e LH, enquanto baixos níveis permitem sua liberação, porém sem picos episódicos de secreção [6; 9; 10]. Além da testosterona, os estrógenos (na forma de estradiol), a inibina e a ativina também exercem ações feedback sobre o eixo hipotálamo-hipófise, de forma negativa, exceto para a ativina [1; 8; 10]. As concentrações de estradiol modulam a secreção de gonadotrofinas em resposta ao GnRH na hipófise [18].

Características importantes do desenvolvimento reprodutivo de touros são influenciadas pelo tamanho das gônadas e secreção de estradiol pelas células de Sertoli na fase pré-puberdade precoce, em conjunto com a habilidade do animal para secretar, pelo menos, 1 ng/mL de testosterona na circulação periférica [22]. Posteriormente, sob estímulo do LH, as células de Leydig sozinhas ou em alguma associação com as células de Sertoli, são responsáveis pela secreção de estradiol [21].

Como citado anteriormente vários sistemas hormonais atuam sobre o eixo H-H-T, modulando-o. Dentre estes, pode-se citar a prolactina, que atua em tecidos andrógeno- sensíveis, associada ao LH e ao hormônio do crescimento (GH), para o controle da síntese de receptores de LH nos testículos, além de participar da ativação da síntese de andrógenos e do estímulo à espermatogênese, principalmente em carneiros, ratos e suínos [1; 8]. A prolactina potencializa os efeitos do LH na esteroidogênese, por sua ação sobre os receptores de LH, e também tem efeito feedback negativo sobre a secreção de GnRH [11].

Os hormônios tireoideanos são fundamentais para o início da diferenciação das células de Sertoli e Leydig para a fase adulta. Nas células de Leydig, eles atuam sobre a proteína STAR (proteína regulatória aguda da esteroidogênese), a qual é responsável pelo transporte de colesterol para a mitocôndria no processo de esteroidogênese, enquanto nas células de Sertoli estimulam a secreção de lactato, hormônio anti-mülleriano (AMH), enzima aromatase, receptor de estradiol e ABP [1; 15; 25].

Nos machos, os somatotrofos hipofisários são arranjados de forma agrupada e a secreção de GH induzida pelo cálcio é distinta das fêmeas. Na puberdade, estes agrupamentos de somatotrofos aumentam as concentrações de cálcio e a atividade secretória [14], atendendo às demandas desta fase reprodutiva, pois o GH afeta a função testicular por modular a esteroidogênese e a gametogênese [1].

Outro hormônio que influencia as respostas do eixo H-H-T é a grelina, que participa do controle de funções-chave testiculares, tais como expressão gênica nos túbulos seminíferos, secreção de testosterona e proliferação de células de Leydig [5].

As muitas substâncias que modulam o eixo H-H-T e suas respostas se apresentam, em sua maioria, de modo espécie-específico com relação às células testiculares que as secretam, à localização de seus receptores e às vias de sinalização que utilizam, resultando em ações distintas nos diferentes animais. Da mesma forma, as diferenças ocorrem para a secreção e ação no hipotálamo e na hipófise e para os efeitos de outros hormônios.

Momentos fisiológicos reprodutivos com variações endócrinas

A regulação da secreção hormonal depende de vários mecanismos, muitos deles interligados. Fatores internos e externos atuam estimulando ou inibindo a secreção dos hormônios, e uma interpretação adequada dos perfis endócrinos obtidos desses animais deve considerar estas influências [9]. A interação de todos os fatores envolvidos traduz a informação de estímulos ambientais e internos em cada momento específico e modelo de secreção hormonal, a fim de habilitar a reprodução nos períodos em que existam maiores chances de sucesso [2].

As diferentes fases reprodutivas dos machos e algumas situações clínicas envolvem variações nos perfis endócrinos e de outros metabólitos, bem como de características produtivas e reprodutivas, cujas avaliações precisam ser associadas à quantificação hormonal a fim de garantir um diagnóstico mais preciso. Muito tem sido estudado sobre estes períodos, resultando em inúmeros artigos científicos relevantes. No entanto, existem dificuldades para a utilização destas quantificações hormonais como padrões de protocolos rotineiros na produção animal. Tais dificuldades decorrem dos custos dos exames e da logística de laboratórios e equipamentos, que variam com o tipo de protocolo de dosagem hormonal utilizado [26], além das diferenças intrínsecas e extrínsecas ao animal.

Como já citado, a rede de células endócrinas tem ampla plasticidade com as diferentes condições a que o animal é exposto [14], considerando seu desenvolvimento desde o nascimento até a vida reprodutiva adulta e suas condições de criação e manutenção. Pequenas variações nos níveis de testosterona sérica podem representar importantes flutuações no ambiente intratesticular [8]; no entanto, sua detecção e interpretação não são uma tarefa fácil. As concentrações de testosterona podem variar como resultado de diferença na receptividade funcional do testículo ao LH, mais do que na sensibilidade do eixo hipotálamo- hipófise ou no metabolismo periférico e *clearance* de testosterona [27]

As concentrações sanguíneas de hormônios entre indivíduos e momentos variam amplamente, em função de fatores como a taxa de secreção, a liberação, o *clearance* metabólico, a idade, a frequência e as condições da amostragem e do ensaio [9; 28]. Os padrões hormonais usados como referência são muito variáveis entre autores, principalmente por considerarem, majoritariamente, a espécie e o sexo, sem discriminar fase reprodutiva e idade, condições de criação e de manejo, alimentação, entre outros.

Na vida reprodutiva, o momento da puberdade e a estacionalidade reprodutiva tem sido amplamente avaliados, em termos endócrinos, visando possíveis manipulações exógenas para seu controle.

Puberdade

Sob o ponto de vista econômico, a idade na qual os animais alcançam a puberdade é uma das características mais importantes na produção animal [6; 16]. Vários hormônios, fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias vêm sendo estudados em sua participação no processo fisiológico da puberdade, na busca por um possível marcador endócrino ou bioquímico desta fase.

As células de Sertoli imaturas, desde a vida fetal, produzem o AMH, cujas concentrações são elevadas nos primeiros meses de vida pré-púbere, durante o período de proliferação destas células, reduzindo-se posteriormente, em uma correlação negativa com as concentrações de testosterona, e mantendo-se em níveis baixos e constantes [13; 28]. Um estudo com bezerros verificou a possibilidade de que a correlação negativa entre AMH e testosterona, no período peri-puberdade, pudesse ser usada como um reflexo da maturação das células de Sertoli, inclusive permitindo predizer a produção espermática através da quantificação das concentrações destes dois hormônios. No entanto, seus resultados não comprovaram essa hipótese [13], assim como aqueles encontrados por Costa Filho *et al.* [29] em bezerros Nelore. Por outro lado, as concentrações de AMH podem ser indicativas de função anormal das células de Sertoli [13].

O sistema kisspeptina também vem sendo avaliado no macho, com envolvimento na puberdade, por estimular a secreção de GnRH e LH, mas os resultados ainda são conflitantes, sugerindo a necessidade de mais estudos que permitam confirmar se a kisspeptina exógena ou seus análogos podem estimular a antecipação da puberdade ou os comportamentos sexuais, incluindo animais estacionais, além de sua produção e ação em tecidos periféricos como as células de Leydig [2; 12; 24]. Em cabritos pré-púberes, a resposta secretória de LH estimulada por kisspeptina exógena, com consequente aumento da testosterona, é maior que nos animais pós-púberes [30], demonstrando a importância do AMH na puberdade dos machos caprinos. A expressão de kisspeptina nas células de Leydig é mediada pelo LH para controlar a espermatogênese; já sua administração exógena por longo tempo regula negativamente a maturação gonadal [12], o que dificulta sua utilização em protocolos de manipulação hormonal.

Em testículos na peripuberdade, o estradiol pode estar envolvido em adiantar a diferenciação das células de Sertoli e de Leydig [1]. As células hipofisárias também sofrem modificações nesta fase, como ocorre nos agrupamentos de somatotrofos, resultando em maior atividade secretória, estimulada pelo hormônio hipotalâmico de liberação de GH – GHRH, com as maiores concentrações de GH contribuindo para a diferenciação das células testiculares [14].

Outro hormônio com papel crucial no início da puberdade em machos é a leptina, por seu efeito estimulatório sobre a secreção dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise, principalmente atuando via peptídeos cerebrais com ação nos neurônios GnRH [2; 16; 17; 19]. Uma característica importante deste hormônio é cruzar a barreira hematotesticular, o que sugere que fontes de leptina dos testículos e de outras regiões corporais podem estar envolvidas na regulação direta da função reprodutiva gonadal, especialmente a esteroidogênese em machos pré-púberes [17].

Até o momento os resultados obtidos nos diferentes experimentos ainda não permitem definir um marcador endócrino que seja fidedigno para a puberdade, necessitando de outros exames complementares já realizados há vários anos.

Estação reprodutiva

Enquanto o sistema circadiano hipotalâmico modula, em várias extensões, a atividade dos três eixos endócrinos maiores do organismo, sinais endócrinos rítmicos podem criar

feedbacks sobre os relógios circadianos centrais e periféricos, proporcionando estímulos sistêmicos para coordenar o comportamento circadiano e as funções fisiológicas [4; 31].

A complexa combinação do ritmo circanual endógeno dirigido e sincronizado pela luz e secreção de melatonina da glândula pineal constituem o mecanismo de controle da estacionalidade [1; 6; 32].

A testosterona é, entre outras funções, responsável pela espermatogênese e comportamento sexual; porém, em função da estacionalidade reprodutiva de algumas espécies, o padrão de secreção de testosterona pode limitar a eficiência reprodutiva destes machos durante alguns períodos do ano [15; 33].

Em cada espécie, mesmo com a reprodução em base estacional, as diferentes raças podem expressar graus variáveis desta estacionalidade [32]. Nos carneiros e nos búfalos, que são animais estacionais de fotoperíodo decrescente, a magnitude das modificações na duração do dia pode interagir com a raça para determinar a duração máxima do pico estacional de hormônios [6; 33], estimulado pelas concentrações elevadas de melatonina. Já em equinos, animais estacionais de fotoperíodo crescente, a produção de melatonina é baixa na estação reprodutiva, o que leva ao ápice da secreção de GnRH e gonadotrofinas, para promover a função testicular máxima, refletida na alta produção espermática [1].

Alterações no sistema circadiano do relógio biológico também impactam grandemente o sistema endócrino e vice-versa [4; 31], e podem-se refletir nas respostas reprodutivas.

Suspeitas clínicas de subfertilidade ou infertilidade

As causas da infertilidade masculina só podem ser definidas através de uma rigorosa avaliação epidemiológica, genética e ambiental [8; 34], associando às condições de manejo as quais os animais são submetidos. É conhecido que, com o envelhecimento, a sensibilidade das células de Sertoli ao LH diminui, com deficiente transdução de sinal, resultando em menores concentrações circulantes de testosterona [3], ainda que isso não seja um problema marcante para animais de produção, cuja vida média, normalmente, não atinge esta fase, mas é de importância nos pequenos animais e, por vezes, em equinos.

Os fatores parácrinos e endócrinos permitem que as células somáticas se comuniquem umas com as outras (incluindo também as células mioides peritubulares) e com as células germinativas, e qualquer quebra na comunicação local entre elas pode levar ao declínio na fertilidade [1].

Assim como no envelhecimento, a exposição aos disruptores endócrinos ou poluentes ambientais tem efeitos sobre a produção de AMPc estimulada pelo LH e sobre o transporte de colesterol e seu metabolismo na mitocôndria, refletindo-se na esteroidogênese das células de Leydig [3]. Os disruptores endócrinos são compostos químicos que alteram a estrutura e função do sistema endócrino, e podem contribuir para desordens reprodutivas, metabólicas e neuroendócrinas ou de outros sistemas [8; 35]. Os mecanismos comuns da ação dos disruptores endócrinos incluem agonismo e antagonismo de hormônios, a modulação da expressão dos receptores hormonais, e a interferência com produção e/ou *clearance* do hormônio [35].

No caso de suspeitas de alterações endócrinas, em algumas delas pode-se utilizar testes de desafio com substâncias farmacológicas estimuladoras ou inibidoras dos hormônios do eixo H-H-T [11]. O mais utilizado é o desafio com GnRH ou seus análogos. No entanto, os momentos mais adequados para estes desafios e para as colheitas de sangue ou outras matrizes biológicas precisam ser definidos a cada condição clínica. Um adequado exame físico associado a outros exames complementares mais acessíveis, como radiografia, ultrassonografia ou exames laboratoriais de perfil hematológico e bioquímico, são mais rápidos e efetivos. Em cães com hipogonadismo hipogonadotrófico ou com alterações de diferenciação sexual, a avaliação dos níveis de testosterona em repouso e após a estimulação com gonadotrofina coriônica humana - hCG ou GnRH, muitas vezes é prejudicada pela variação dos valores de referência entre os laboratórios (e mesmo nos diferentes estudos científicos) e a sobreposição entre os níveis basais normais deste andrógeno e o hipotestosteronismo [34]. Em casos de neoplasias de células de Sertoli, a atividade aromatase encontra-se aumentada, levando a um hiperestrogenismo [36].

Em equinos, alterações nas concentrações de FSH e de estradiol podem estar associadas à degeneração testicular, em consonância com avaliações morfológicas gonadais, assim como aumentos de estrógenos com diminuições de gonadotrofinas são encontradas em garanhões inférteis, mesmo que a testosterona não se modifique [revisado por 1].

Condições relativas aos testes endócrinos

Os valores de referência utilizados como faixa de normalidade devem sempre ser compatíveis com o indivíduo testado, principalmente no caso dos hormônios esteroides, ressaltando que, os valores fornecidos pelos fabricantes dos kits de dosagem hormonal, podem não ser compatíveis com a população estudada [7]. No Brasil, a maioria dos testes é feita com o uso de kits humanos importados, com exceções para alguns hormônios de pequenos animais, necessitando de validação na espécie estudada [26]. Mesmo trabalhando-se com kits espécie-específicos, ainda é necessário considerar as variações referentes à raça, à idade, ao momento reprodutivo, à estação do ano, às condições nutricionais (incluindo se o animal estava em jejum ou recém-alimentado) e sanitárias, ao manejo de colheita e manipulação da amostra, ao momento do dia, à fase reprodutiva, entre outros, que podem interferir com os resultados e com a faixa de normalidade.

Alguns hormônios podem ser quantificados com uma colheita de sangue no dia, como o FSH; entretanto, aqueles que têm pulsos de secreção, como o LH (em fêmeas), precisam de várias amostras de sangue colhidas em 24 horas, estabelecendo-se um ritmo circadiano. Outros hormônios apresentam variações na sua secreção em períodos mais longos que um dia, na dependência de fatores externos, como o ambiente, e podem exigir quantificação sequencial em dias, semanas ou meses, como no ritmo circanual [9; 33]. Considerando-se o eixo H-H-T, para detectar os pulsos de secreção há necessidade de colheitas que reflitam as variações minuto-a-minuto e por longos períodos de tempo, determinando a frequência de pulsos, e que poderiam ocorrer a cada 20 minutos durante 48 horas [18]. No entanto, além das concentrações dos hormônios envolvidos em cada eixo endócrino, também há uma rela-

ção importante dos genes relacionados ao mecanismo de relógio biológico, controlado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo, que afetam os ritmos biológicos de secreção [4] e, em consequência, as respostas hormonais obtidas nos exames.

Ainda que as dosagens hormonais sejam mais rotineiramente feitas em amostras de sangue, nos últimos anos vem sendo utilizadas outras matrizes biológicas não invasivas, como fezes, urina e pelos, para monitorar hormônios esteroides em diferentes momentos, fisiológicos ou não, de animais domésticos e, principalmente, silvestres, tendo-se em conta os ciclos de biotransformação e excreção destes hormônios [26; 37; 38]. Para isso, no entanto, é necessário considerar a dinâmica do ciclo de *clearance* e excreção hormonal de cada espécie animal e hormônio estudado [9], considerando-se as principais vias de excreção como rins (através da urina) e bile (através das fezes), e a validação dos resultados em relação aos níveis hormonais sanguíneos.

Em suínos, um estudo em que os animais tiveram os metabólitos de testosterona quantificados nas fezes, desde quatro dias pré-desafio com análogo de GnRH (detectando as concentrações basais) até seis dias pós-desafio (detectando as concentrações de pico), concluiu que amostras fecais refletem as variações fisiológicas nos níveis de testosterona [36]. Por outro lado, a quantificação de testosterona nos pelos de cães não apresentou correlação com os níveis sanguíneos do hormônio [38]. Os autores citam que o pelo incorpora lentamente os hormônios circulantes conforme o seu crescimento, resultando em um perfil de concentrações hormonais de longo tempo, consequentemente não influenciado pelas flutuações fisiológicas diárias quando comparado com matrizes como o sangue. Este resultado pode ser importante para monitoramento de testosterona em animais silvestres, principalmente por ser menos invasivo e estressante.

Outro conceito que vem sendo considerado é sobre a microbiota intestinal, a qual tem uma marcante influência sobre a saúde e fisiologia do seu hospedeiro, através de sua habilidade para produzir uma grande quantidade de agentes hormonais, que podem ter papel regulatório na atividade de sistemas locais e não locais, e dos órgãos, incluindo funções cerebrais e comportamentais, cardiovasculares e hepáticas, as respostas ao estresse e imune, e o metabolismo [39]. Uma vez que as funções do organismo estejam alteradas pelas substâncias liberadas da microbiota intestinal, como ocorre nas mudanças de dieta, os processos reprodutivos também poderão sofrer os reflexos destas modificações, principalmente cerebrais e metabólicas, e isso precisa ser considerado na avaliação endócrina do animal.

Considerações finais

A quantificação do perfil endócrino é importante em uma série de condições, mas seu uso implica em que muitas premissas com relação ao indivíduo testado (espécie, raça, idade), à metodologia de colheita e à compreensão das limitações técnicas sejam incorporadas ao raciocínio interpretativo crítico dos resultados da dosagem hormonal [7]. Em animais de produção, os resultados de exames hormonais devem ser considerados em conjunto com outras avaliações mais específicas da função reprodutiva masculina, como o exame andrológico

com auxílio da ultrassonografia, em função dos custos ainda elevados para dosagens em larga escala e da variabilidade dos resultados em decorrência de muitos fatores influenciadores, além de utilizar protocolos adaptados a cada condição de testagem.

Referências bibliográficas

[1] Roser JF. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. Anim Reprod Sci 2008; 107:179-196.

[2] Di Giorgio NP, Bizzozzero-Hiriart M, Libertun C, Lux-Lantos V. Unraveling the connection between GABA and kisspeptin in the control of reproduction. Reproduction 2019; 157:R225- R233.

[3] Wang Y, Chen F, Ye L, Zirkin B, Chen H. Steroidogenesis in Leydig cells: effects of aging and environmental factors. Reprod 2017; 154:R111-R122.

[4] Neumann AM, Schmidt CX, Brockmann RM, Oster H. Circadian regulation of endocrine systems. Auton Neurosci 2019; 216:1-8.

[5] Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Ramé C, Froment P. Ghrelin in female and male reproduction. Int J Pept 2010; 2010:ID158102.

[6] Sharma RK, Jerome A, Purohit GN. Reproductive physiology of the male and female buffalo. In: Bubaline Theriogenology. Ithaca: IVIS, 2014.

[7] Vieira JGH. Avaliação dos potenciais problemas pré-analíticos e metodológicos em dosagens hormonais. Arq Bras Endocrinol Metab 2002; 46:9-15.

[8] Hotaling JM, Patel Z. Male endocrine dysfunction. Urol Clin N Am 2014; 41:39-53.

[9] Pineda MH, Dooley MP. McDonald's veterinary endocrinology and reproduction. 5th ed. Iowa: Blackwell, 2003.

[10] Fernandes CEC, Souza, MIL. Aspectos gerais da fisiologia no aparelho reprodutivo do touro. http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php? arq_pdf=Livro35>

[11] Engelking LR. Fisiologia endócrina e metabólica em Medicina Veterinária. 2nd ed. São Paulo: Roca, 2010.

[12] Salehi S, Adeshina I, Chen H, Zirkin BR, Hussain MA, Wondisford F, Wolfe A, Radovick S. Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. Endocrinology 2015; 156:1514-1522.

[13] Kitahara, G, Kamata R, Sasaki, Y, Ali HES, Mido S, Kobayashi I, Hemmi K, Osawa T. Changes in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves. Dom Anim Endocrinol 2016; 57:127-132.

[14] Mollard P, Schaeffer M. Imaging endocrinology in animal models of endocrine disease. Best Prac Res Clin Endocrinol Metab 2018; 32:317-328.

[15] Todini L. Thyroid hormones in small ruminants: effects of endogenous, environmental and nutritional factors. Animal 2007; 1:997-1008.

[16] Quintero JC, Ruíz-Cortez ZT. Efectos de la leptina en el inicio de la pubertad en animales machos. Rev Colomb Cienc Pecu 2008; 21:97-108.

[17] Laundry D, Cloutier F, Martin LJ. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. Reprod Biol 2013; 13:1-14.

[18] Ferasyi TR, Hugh P, Barrett R, Blache D, Martin GB. Modeling the male reproductive endocrine axis: potential role for a delay mechanism in the inhibitory action of gonadal steroids on GnRH pulse frequency. Endocrinol 2016; 157:2080-2092.

[19] Guan Y, Martin GB. Cellular and molecular responses of adult testis to changes in nutrition: novel insights from the sheep model. Reproduction 2017; 154:R133-R141.

[20] Hess RA, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparision. Anim Reprod 2004; 1:5-30.

[21] Aguiar GV, Araújo AA, Moura AAA. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. R Bras Zootec 2006; 35:1629-1638.

[22] Moura AA, Souza CEA, Erickson BH. Early prepubertal testis criteria, seminiferous epithelium and hormone concentrations as related to testicular development in beef bulls. Anim Reprod Sci 2011; 124: 39-47.

[23] Bagu ET, Cook S, Gratton CL, Rawlings NC. Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. Reproduction 2006; 132:403-411.

[24] Beltramo M, Robert V, Decourt C. The kisspeptin system in domestic animals: what we know and what we still need to understand of its role in reproduction. Dom Anim Endocrinol 2020; 73: 106466.

[25] Sanford LM, Dickson KA. Prolactin regulation of testicular development and sexual behavior in yearling Suffolk rams. Small Rumin Res 2008; 77:1-10.

[26] Pereira RJG. Métodos não-invasivos para análises hormonais aplicadas aos estudos de ecologia e etologia. R Bras Zootec 2007; 36:71-76.

[27] Roselli CE, Stormshak F, Stellflug JN, Resko JA. Relationship of serum testosterone concentrations to mate preferences in rams. Biol Reprod 2002; 67:263-268.

[28] Bourgon SL, Amorim MD, Miller SP, Montanholi YR. Associations of blood parameters with age, feed efficiency and sampling routine in young beef bulls. Livest Sci 2017; 195:27-37.

[29] Costa Filho LCC, Soligo EC, Peixoto AS, Barbosa FB, Rossignolo EAA, Assis TS, Oliveira VM, Souza MIL, Silva, EVC. Avaliação do hormônio Anti-Mülleriano à desmama e precocidade sexual de machos Nelore. Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2:67- 70, 2017.

[30] Saito H, Sawada T, Yaegashi T, Goto Y, Jin J, Sawai K, Hashizume T. Kisspeptin-10 stimulates the release of luteinizing hormone and testosterone in pre- and post-pubertal male goats. Anim Sci J 2012; 83:487-492.

[31] Boden MJ, Kennaway DJ. Circadian rhythms and reproduction. Reproduction 2006; 132:379-392.

[32] Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpaux B. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. Reprod Dom Anim 2008; 43:40-47.

[33] Souza MIL, Uribe-Velásquez LF, Bicudo SD, Ramos AA. Determinação dos ritmos circadianos e circanuais nas concentrações plasmáticas de testosterona e androstenediona em machos ovinos. Arq Ciên Vet Zool Unipar 2006; 9:123-127.

[34] Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de pequenos animais. 5ª ed. São Paulo: Elsevier, 2015.

[35] Patisaul HB, Fenton SE, Aylor D. Animal models of endocrine disruption. Best Prac Res Clin Endocrinol Metab 2018; 32:283-297.

[36] Henrique FV, Lordão FNF, Pessoa MA, Carneiro RS. Tumor de células de sertoli e seminoma difuso em cão com critorquidismo bilateral – relato de caso. Rev Bras Med Vet 2016; 30:217-221.

[37] Ferreira MF, Nunes BM, Claudio JM, Amaral, RS. Validação fisiológica da dosagem de metabólitos fecais de testosterona em suínos machos. Rev Cient Avic Suin 2017; 5:1-8.

[38] Calamari CV, Viau P, Nichi M, Martins GS, Sobral G, Mangueira Dias JH, Oliveira CA. Hair as na alternative noninvasive matrix: sources of variation in testosterone levels. Dom Anim Endocrinol 2020; 72:106477.

[39] O'Callagham TF, Ross RP, Stanton C, Clarke G. The gut microbiome as a virtual endocrine organ with implications for farm and domestic animal endocrinology. Dom Anim Endocrinol 2016, 56:544-555.

Agradecimentos: Ao apoio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS/MEC).

Palestra Especial

Reunião Anual da

V ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

Relações entre defeitos espermáticos e taxas de gestação

Luis Alfredo Garcia-Deragon[1]
Neimar Correa Severo[1]
ncsevero@gmail.com
Solange Martins Almeida[1]
João Pedro Brandão Zandonaide[1]

Abstract: Almost 100 years the research has tried to suggest minimum standards for the morphological characteristics of bovine sperm and to relate them to fertility both for bulls in natural breeding and in artificial insemination. Predicting the fertility of a bull or a semen match based on laboratory tests is still inaccurate. The diversity of attributes necessary to give the sperm a fertilizing capacity the heterogeneous constitution of the sperm population in the samples and the limitations of fertility assessment hinder the possibility of predicting the fertility of a specific semen sample. The limitation of laboratory tests are demonstrate in predicting in vivo fertility in these breeders and reinforces the need for field fertility tests. However, sperm morphology has been the subject of many debates and controversies in research and field practicing and artificial insemination. Despite the many suggestions for minimum and maximum parameters for major, total and individual defects, we must consider that, as a result, discussions and suggestions of standards for sperm morphology are always necessary within animal andrology.

Keywords: sperm morphology, fertility, bulls.

Palavras-chave: morfologia espermática, fertilidade, touros.

Introdução

As taxas de gestação são dependentes de múltiplos fatores. Dentre eles, possivelmente os mais importantes são: potencial de fertilidade do touro usado na inseminação ou na monta natural, qualidade do sêmen, escore corporal e categoria das fêmeas, sanidade do rebanho, fazenda, manejo durante a inseminação e inseminador.

A interação espermática com o trato reprodutivo da vaca após a deposição do sêmen tem uma profunda influência nas taxas de gestação e fornece questões fundamentais que ainda não foram resolvidas, apesar de estudos consideráveis. Os espermatozoides fertilizantes são selecionados pelo trato entre bilhões ou milhões de espermatozoides depositados pela monta natural ou inseminação artificial, mas normalmente somente um fertiliza o oócito. O caminho que os espermatozoides bem-sucedidos fazem para alcançar o oócito é longo e tortuoso, com muito líquido viscoso, pregas da mucosa sem saída e células imunológicas potencialmente hostis. Os reservatórios liberam um número finito de espermatozoides armazena-

[1] Alta Genetics do Brasil Ltda.

dos, atuando como um regulador para evitar a polispermia, mas, ainda assim, fornecem um número apropriado de espermatozoides férteis para o oviduto superior. O epitélio do istmo retém preferencialmente espermatozoides que possuem acrossomas intactos e morfologia normal, aumentando a probabilidade de um número adequado de espermatozoides férteis no local da fecundação [1]. A espermatogênese anormal pode ser atribuída a circunstâncias específicas que afetam o touro, como condições climáticas extremas, baixa nutrição, obesidade, enfermidades com febre intermitente, transporte e adaptação a novos ambientes, tendo sido identificadas por vários autores na Austrália [2]. Aquele país trabalha com um considerável número de touros zebu e azebuados e a Australian Association of Cattle Veterinarians recomenda trabalhar com um mínimo de 70% de espermatozoides normais no ejaculado como qualidade aceitável [3], assim como o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4].

Em relação à morfologia espermática, há uma deficiência de estudos prospectivos desenhados para avaliar com exatidão a relação entre as características específicas e a fertilidade a campo. Isso ocorre, provavelmente em parte, devido ao grau do defeito que coexiste com o número de células normais adequadas para uma fertilidade normal [5]. A determinação da percentagem de espermatozoides morfologicamente normais é altamente repetível e está fortemente correlacionada com os dias de concepção e nascimentos de bezerros em rebanhos leiteiros [6] e de corte [7].

A morfologia espermática anormal tem sido relacionada há muito tempo com infertilidade do macho e a avaliação das anormalidades é fundamental para a análise da qualidade do sêmen [8;9;10]. Relatos mais recentes correlacionando a frequência de defeitos morfológicos no espermatozoide e a fertilidade da amostra geralmente concordam com os primeiros estudos [5;11;12]. O conceito de defeitos compensáveis do sêmen deveria ser considerado ao se discutir morfologia e motilidade espermática [13].

Alterações morfológicas que comprometem a fertilidade

Defeitos de acrossoma

Compreendem alterações na constituição da membrana acrossômica, formada durante a fase acrossomal da espermiogênese. O acrossoma contém múltiplas enzimas que promovem a fertilização pela degradação da membrana externa da zona pelúcida do oócito, assim permitindo a penetração do espermatozoide. Para uma ótima fertilidade, o espermatozoide deve ter o acrossoma normal caracterizado por uma superfície lisa, nítida e uniforme da crista apical [14].

Acrossoma *knobbed*

A alteração do acrossoma *knobbed (protuberante*) pode ser em forma de vesícula (vesiculoso), achatada ou dentada. A aparência mais comum no touro é "achatada ou dentada" no ápice do acrossoma devido à dobra dele, podendo apresentar-se de forma muito tênue, o que dificulta a observação, levando a erro na contagem e subestimando o problema. É oportuno ressaltar que a aparência do acrossoma "enrugado e incompleto" se deve a vacúolos no núcleo do espermatozoide.

A causa do desenvolvimento anormal do acrossoma pode ser explicada por efeitos ambientais adversos, em que normalmente se apresenta junto a outras anormalidades, ou devido a efeitos genéticos [15;16;17] que sugerem um modo de herança autossômica recessiva [18;19]. Alguns touros podem ter predisposição genética para desenvolver o defeito em condições ambientais adversas [5]. O defeito pode manifestar-se com outras anormalidades espermáticas nos processos degenerativos testiculares por lesão traumática, por perda da termorregulação e por doenças sistêmicas. Geralmente apresenta baixa prevalência, mas, no entendimento deste estudo, não deveria ultrapassar 10% no espermiograma. Espermatozoides com *knobbed* têm reduzida capacidade de se ligar à zona pelúcida, portanto, espermatozoides normais podem realizar a fertilização, sugerindo que esse defeito poderia ser considerado compensável [20]. Também se postula que espermatozoides com acrossoma achatado ou dentado são menos competitivos na fertilização que espermatozoides normais [21]. O touro pode ser estéril se estiver muito afetado [22] ou se tiver a fertilidade muito diminuída quando há alta incidência de *knobbed* (83%-89%) no sêmen, ainda que seja na monta natural [5].

Acrossomas destacados

Os acrossomas destacados podem ser encontrados no sêmen de touros após longos períodos de repouso sexual e, quando expostos ao serviço de monta, diminuem consideravelmente [23]. O processo de refrigeração do sêmen bovino a 4ºC também pode ocasionar o desprendimento do acrossoma.

Defeitos de cabeça

Compreendem as alterações de forma, contorno e tamanho da cabeça espermática. Estão associados a alterações transitórias ou permanentes na espermatogênese, decorrentes de lesões traumáticas testiculares, estresse calórico, febre, excesso de proteína e/ou energia na ração, doenças sistêmicas, uso prolongado de corticoides, hipoplasias testiculares e podem ser de origem genética [19]. Os defeitos de cabeça diminuem a fertilidade de forma temporária (subfertilidade) ou permanente (infertilidade) e estão associados à baixa taxa de clivagem e ao fraco desenvolvimento embrionário.

Cabeças piriformes e estreitas

Há ampla variedade de aberrações na forma da cabeça do espermatozoide do sêmen do touro. O defeito piriforme é o mais comum e a forma mais clássica apresenta a região acrossômica praticamente normal e a região pós-acrossomal estreitada. Esse defeito ainda inclui considerável variação de formas que são ligeiramente menores na região pós-acrossomal até as que são muito estreitas e podem ser encontradas no mesmo ejaculado, o que pode dificultar muito a interpretação do que é normal ou alterado. As cabeças estreitas (delgadas) são aquelas em que ambas as regiões da cabeça são estreitas, podendo ser, às vezes, menores ou alongadas. Como as cabeças piriformes, também apresentam ampla variação dificultando, às vezes, a interpretação. Alguns touros apresentam formatos de espermatozoides que são mais estreitos em sua maioria, o que pode representar o perfil particular do touro e não com-

prometer a fertilidade. Possivelmente as duas formas, piriforme e estreita, seriam o mesmo defeito, desde que as duas tenham um núcleo menor.

O desenvolvimento desses defeitos pode se dar em função da idade, origem ambiental ou fator genético, sendo que alguns touros podem ter predisposição genética e as alterações se apresentarem quando há efeitos ambientais adversos. Na maioria dos casos, cabeças piriformes aparecem quando há modificações do normal funcionamento do testículo, como alteração da termorregulação testicular e do sistema endócrino que regula a função testicular. Essa alteração endócrina pode ser local, afetando a termorregulação testicular, ou sistêmica, modificando todo o balanço hormonal, como, por exemplo, nos casos de estresse causado por temperatura ambiente extrema, mudanças climáticas, problemas clínicos, regimes alimentares extremos etc. Touros com hipoplasia testicular e/ou testículos menores têm tendência a apresentarem mais defeitos de cabeças anormais [5]. Espermatozoides com anormalidades de cabeça geralmente podem ter acrossomas normais e boa motilidade, o que poderia permitir penetrar a zona pelúcida e iniciar a reação de zona. No entanto, se o sêmen tiver uma alta percentagem de alterações, a fertilidade será baixa.

O impacto das cabeças piriformes sobre a fertilidade tem sido bem documentado. Em fêmeas submetidas à superovulação ficou caracterizada a redução da fertilização dos oócitos [24]. Em outro estudo [25] com altas percentagens de piriformes e grupo controle, as taxas de fertilização na FIV foram de 68,5% e 84,4% respectivamente. Na inseminação artificial com novilhas sincronizadas as taxas de prenhez foram de 37% e 61% respectivamente, sendo as taxas de perda de embriões e perdas fetais de 23% e 8% entre 22 e 60 dias. Os defeitos piriformes interrompem vários estágios do processo de fertilização, incluindo transporte [26], penetração da zona pelúcida e ligação ao oócito [27] e acontecimentos pós-fertilidade [25].

Vacúolos nucleares (*pouch formation*, diadema, crateras)

Defeitos nucleares têm sido descritos no touro e outras espécies [28]. O defeito é caracterizado por uma invaginação da membrana nuclear dentro do nucleoplasma [29]. As causas que têm sido postuladas incluem estresse, distúrbio na termorregulação testicular, infecções virais, toxinas e fatores hereditários [30]. A incidência varia muito desde 0% até 100% [29] e os vacúolos podem manifestar-se em forma única ou múltipla. No touro normalmente há três formas: um único vacúolo em qualquer local da cabeça, grandes vacúolos confluentes e múltiplos vacúolos na junção pós-acrossomal lembrando um colar conhecido por diadema [31]. Em um estudo, vacas superovuladas inseminadas com sêmen contendo 80% de vacúolos nucleares apresentaram 18% de fertilização contra 72% do grupo controle [24]. Um mesmo touro que foi submetido a regime alimentar de alta energia para exposição, usado em transferência de embriões, com 26% e 1% de diadema, apresentou 62% e 6% de embriões degenerados respectivamente [32], o que demonstra claramente os efeitos do ambiente sobre a espermatogênese e da alteração espermática sobre a qualidade dos embriões produzidos. Espermatozoides com vacúolos podem atravessar o trato reprodutivo da fêmea e acessar o oócito competindo, assim, na fertilização [33]. O nível de vacúolos pode variar drasticamente em pequeno intervalo de tempo sem razão aparente, o

que sugere predisposição genética ao problema. Devido a isso, touros com o problema têm que ser monitorados frequentemente [30].

Macrocefálicos e microcefálicos

São aquelas alterações que mostram que as cabeças são maiores ou menores comparadas ao tamanho normal para o sêmen de um determinado touro. São defeitos raros, e tem sido sugerido pela literatura que tenha base genética [34]. É improvável que esses espermatozoides sejam capazes de participar na fertilização e no desenvolvimento do oócito [5]. Cabeças gigantes apresentam frequentemente formas enroladas ou com cristas ao longo do eixo maior da cabeça e com vários grânulos e podem ser diploides ou poliploides [34].

Condensação anormal do DNA

A cromatina é o complexo formado pela interação de proteínas de diferentes classes com o DNA nuclear nas células eucarióticas. Nos espermatozoides, a cromatina possui organização complexa e bem diferente das células somáticas. Durante a espermiogênese, a cromatina das espermátides sofre um profundo rearranjo e o DNA torna-se extremamente condensado. Isso ocorre por causa de dois processos distintos: a remodelação da matriz nuclear das espermátides, que muda a forma esférica para alongada, e a substituição gradativa das histonas por protaminas, proteínas ricas em resíduos de arginina e cisteína. Nos bovinos, a protamina 1 (P1) representa entre 97% e 99% de todas as proteínas que compõem a cromatina [35;36;37].

Avaliação da estabilidade da cromatina pelo teste de estrutura da cromatina de espermatozoide (SCSA), avaliação da deficiência de protamina utilizando cromomicina A3 (CMA3) e fragmentação do DNA avaliado pelo ensaio COMET são os testes mais comuns usados para analisar a cromatina do espermatozoide em muitas espécies [38]. Um teste mais prático para acessar a condensação do DNA é a coloração de Feulgen, que permite a visualização no microscópio [5;39]. A recomendação é de no máximo 20% de alterações, mas touro com histórico de alta fertilidade apresentou 34,1% de alterações, o que indica a necessidade de investigar mais a desestabilização do DNA e os sistemas de avaliação.

Cabeças soltas normais e anormais

Ejaculados com altas percentagens de cabeças soltas foram associados à baixa fertilidade e à esterilidade [40]. Cabeças soltas normais podem ocorrer devido ao acúmulo anormal de espermatozoides senescentes por falta de transporte na cauda do epidídimo e ampolas. Essa situação parece ser permanente e pode ser confirmada coletando novamente o reprodutor, quando o quadro permanecerá o mesmo [41], enquanto cabeças soltas anormais podem ocorrer devido à formação anormal da placa basal e/ou fossa de implantação [30].

Espermatozoides decapitados

É um raro defeito hereditário resultando em infertilidade reportada em touros da raça Guernsey [42] e da raça Hereford [43], em que a maioria (80% a 100%) dos espermatozoides

estava decapitada. As caudas se apresentam dobradas com gota e mostram motilidade. A anormalidade se dá devido a um defeito na fossa de implantação.

Defeitos de peça intermediária

Decorrem de alterações durante a espermiogênese, especialmente entre as fases 5 e 11 [5]. Compõe esses tipos de defeitos a peça intermediária fraturada, desnuda, enrolada (*dag defect*) e hipoplásica (*tail stump*). Touros com tais defeitos apresentam baixa motilidade e vigor sem que haja melhora nas colheitas subsequentes, indicando que decorrem dos túbulos seminíferos e não do processo de maturação espermática após a espermiogênese. Esses defeitos ocorrem por causa da perda e/ou desorganização dos feixes de fibras internas e das mitocôndrias localizadas na região da porção inicial do flagelo do espermatozoide. A presença de pequenas falhas na bainha mitocondrial dos espermatozoides, associada à fratura da peça intermediária, provocou queda na motilidade do sêmen pós-congelado em um touro Angus importado [44]. Ao teste de exaustão, as amostras dos ejaculados não apresentaram redução significativa na patologia espermática, sugerindo sua possível origem testicular.

Defeitos de cauda

Os defeitos de cauda são os mais comuns no espermiograma bovino, com frequência alta de até 97% [45] e incidência variada de 23% a 25% [46;47]. Diferentes tipos de defeitos de cauda têm sido registrados na literatura, sendo os mais comuns a cauda dobrada simples (*bent tail*), dobrada com gota e fortemente dobrada ou enrolada, que são consideradas como manifestações diferentes de um mesmo problema e denominadas como "reflexo distal da peça intermediária" (*DMR - distal midpiece reflex*) [5]. Essa alteração normalmente ocorre quando os espermatozoides estão no corpo e/ou cauda do epidídimo, retendo a gota citoplasmática na dobra da cauda. A incidência do defeito aumenta quando os espermatozoides passam nos ductos deferentes e atingem o máximo de alterações nas ampolas.

Geralmente os defeitos de cauda acompanham os processos degenerativos testiculares em conjunto com outros defeitos, como os de cabeça, acrossoma, gota citoplasmática proximal e peça intermediária. Touros com hipoplasia testicular tendem a apresentar maior prevalência de defeitos de cauda ou aqueles com alterações epididimárias em função do ambiente hiposmótico no túbulo epididimário [48]. Defeitos de cauda também estão presentes nos processos inflamatórios das adenites vesiculares, ampolas dos ductos deferentes e na epididimite.

Gota citoplasmática proximal (GCP)

Esse defeito origina-se nas fases finais da espermiogênese e refere-se à manutenção dos corpos residuais oriundos das organelas que compõem o citoplasma das espermátides [49]. Embora seja indicativo de processo degenerativo em touros adultos, pode ser encontrada em touros jovens, ainda púberes. Nesses animais, recomenda-se realizar novo exame caso haja mais de 20% de gota citoplasmática proximal. Também está associada à queda na motilidade e no vigor espermático. Seus percentuais são muito variáveis em touros com degeneração

testicular e geralmente são inespecíficos. Pode ocorrer tanto no início quanto no final do processo degenerativo. No entanto, sua permanência em novos exames demonstra um prognóstico desfavorável para a aptidão reprodutiva. Acima de 15% no espermiograma induz à queda da taxa de fertilização e do desenvolvimento embrionário [50]. Em animais jovens a presença de GCP está associada à falta de maturidade sexual e em animais adultos com fertilidade normal, a frequência é baixa, de aproximadamente 2,7%.

Defeitos compensáveis e não compensáveis

A descrição de defeitos compensáveis e não compensáveis é relevante dentro do contexto atual. Defeitos compensáveis são aqueles que comprometem a chegada do espermatozoide ao oócito ou a penetração na sua zona pelúcida (defeitos de peça intermediária, cauda e acrossoma), e não compensáveis são aqueles que podem iniciar a fertilização, mas que comprometem a qualidade do embrião e a manutenção da prenhez (defeitos de cabeça, diadema, vacúolos) [13]. Considerando a capacidade de fertilização de um ejaculado, as anormalidades do núcleo não deveriam ser toleradas além de 15% a 20% dos espermatozoides totais; as anormalidades de acrossoma ou de cauda, que não interferem na habilidade de outras células normais para fertilização do oócito, poderiam ser toleradas até 25%, concordando com padrão de no mínimo 75% de espermatozoides normais no ejaculado [5].

O relato de um caso descrito em Silva *et al.* [51], de um touro Nelore com problema clínico adquirido (orquite unilateral por traumatismo), usado na IATF (3.243 matrizes Nelore) com resultados satisfatórios de prenhez, pode ser um bom exemplo de "defeitos compensáveis". O sêmen foi processado com alta patologia espermática (maior que 37%, total 49%), 30 milhões de espermatozoides totais na palheta e 10 milhões de viáveis. Dentre os defeitos maiores (37%), 23% poderiam ser compensáveis (3% de cauda fortemente dobrada; 2% de cabeça isolada patológica; 11% de fratura de peça intermediária; 7% de cauda dobrada com gota); e nos defeitos menores (12%), 9% poderiam ser compensáveis (2% de cabeça isolada normal e 7% de cauda dobrada).

Alterações morfológicas que não comprometem a fertilidade

Gotas citoplasmáticas distais (GCD)

Localizada próxima do *annulus*, a GCD normalmente se desprende da cauda do espermatozoide quando se mistura ao líquido seminal na ejaculação. Quando o sêmen com alta percentagem de gota distal foi incubado por 15 a 30 minutos ou a amostra foi gentilmente agitada, as gotas foram liberadas dos espermatozoides [5]. A presença da gota distal em alta percentagem no ejaculado não tem sido relacionada com a baixa fertilidade na monta natural, quando não está associada a outras alterações espermáticas [5]. Na inseminação artificial, touros com alta percentagem de gota distal apresentaram taxas de retorno similares aos touros com baixa percentagem da GCD [12].

Implantação abaxial da cauda

Em touros a implantação abaxial sem alterações de peça intermediária ou cauda não reduz a fertilidade e, por isso, deveria ser considerada como uma variação normal no sêmen [5;52]. Abaxial também não é considerada anormalidade no garanhão [53], cachaço [54] e cão [55]. Em um touro Jersey importado, doador de sêmen, foi encontrado um percentual de espermatozoides abaxiais em média de 17,8% no ejaculado, com variação entre 5% a 38%, em 54 ejaculados colhidos, cujas características físicas eram normais. Submetido à prova de fertilidade a campo em uma propriedade com inseminação controlada, não apresentou diferenças significativas quanto aos índices de fertilidade, com 69% de taxa de prenhez, enquanto a média na propriedade não ultrapassava 64% [56]. Esse experimento demonstrou que a implantação abaxial não associada a outras alterações de peça intermediária e cauda não reduz a fertilidade no touro.

Considerações finais

De modo geral, os estudos demonstram que touros com alta qualidade seminal apresentam melhores índices de fertilidade em relação aos de baixa qualidade. Essa relação inexata entre a característica seminal e fertilidade torna difícil demonstrar pequenas variações na fertilidade de indivíduos com alta qualidade seminal usadas tanto em inseminação artificial como em monta natural. Em função disso, a definição dos indicadores da qualidade seminal e, sobretudo, o estabelecimento de limites ou padrões para sua avaliação ainda são extensamente estudados e constituem o principal questionamento quanto à relação com a fertilidade potencial do macho [57].

Prognosticar a fertilidade de um touro ou de uma partida de sêmen com base em exames laboratoriais ainda gera imprecisão. A diversidade de atributos necessários para conferir ao espermatozoide capacidade fertilizante, a constituição heterogênea da população de espermatozoides das amostras e as limitações de avaliação de fertilidade dificultam a possibilidade de prognosticar a fertilidade de uma determinada amostra de sêmen [58].

A avaliação do espermiograma deve ser realizada por quem compreende a espermatogênese normal e anormal, assim como a ultraestrutura espermática normal e anormal. Mesmo com todos os avanços e tecnologias empregados nas análises e no controle de qualidade do sêmen, ainda ocorre variação da fertilidade entre touros aprovados pelo controle de qualidade das centrais de inseminação artificial. Isso demonstra a limitação dos testes laboratoriais na predição de fertilidade *in vivo* desses reprodutores e reforça a necessidade dos testes de fertilidade a campo [59].

Possivelmente, nos próximos anos, estudos das proteínas seminais (proteômica) [60] e da relação dos defeitos com marcadores genéticos (genômica) [61;62] poderão mudar a situação atual sobre a necessidade de testes a campo para avaliar a fertilidade dos touros.

O Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4], publicado em 2013, aponta sugestões de parâmetros mínimos para defeitos maiores totais e individuais que são rigorosos e não foi encontrada sustentação científica para tal definição. Em função disso, entende-se que a discussão e sugestão de padrões mínimos é necessária dentro da andrologia animal.

Referências bibliográficas

[1] TEIJEIRO, J. M.; MARINI, P. E. Apical membranes prepared by peeling from whole porcine oviducts interact with homologous sperm. *Cell and Tissue Research*, 348:213–223, 2012.

[2] HOLROYD, R. G.; FORDYCE, G.; BERTRAM, J. D.; FITZPATRICK, L. A.; DOOGAN, V. J.; TURNER, L. D.; MCGOWAN, M. R. Uso y evaluacion de toros Bos indicus en condiciones de manejo extensivas y semi-extensivas: un resumo de las atividades en el norte de Australia. 4° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Cordoba, Argentina, p. 9-24, 2001.

[3] MCGOWAN, M.; GALLOWAY, D.; TAYLOR, E.; ENTWISTLE, K.; JOHNSTON, P. The Veterinary Examination of Bulls. Australian Association of Cattle Veterinarians, PO Box 34, Indooroopilly, Qld 4068, 1995.

[4] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3. ed. Belo Horizonte, 2013.

[5] BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989.

[6] NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; WAHLSTEN, T.; LJEAS, R.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology*, 79:1153-61, 2013.

[7] HOLROYD, R. G.; DOOGAN, W.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Anim Reprod Sci*, 71:67-79, 2002.

[8] WILLIAMS, W. W.; SAVAGE, A. Observations on the seminal micropathology of bulls. *Cornell Vet*, 15:353-375, 1925.

[9] LAGERLÖF, N. Morphological studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Copenhagem, v. 19, p. 245-266, 1934.

[10] BLOM, E. Interpretation of spermatic citology in bulls. *Fertil Steril*, 1:223-238, 1950.

[11] SAACKE, R. G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In Proceedings of the 3rd Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, NAAB, Chicago, IL, USA, pp. 17–29, 1970.

[12] AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology*, 70:682–691, 2008.

[13] SAACKE, R. G. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70, 473–478, 2008.

[14] LUNSTRA, D. D.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef Bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J Anim Sci*, 55:638-48, 1982.

[15] ROLLINSON, D. H. L.; MAKINSON, J. B. Evidence of an inherited seminal character of semen from associated with infertility of Friesian bulls. *Vet Res*, 61:373, 1949.

[16] HANCOCK, J. L. Evidence of and inherited seminal character associated with infertility of Friesian bulls. *Vet Rec*, 61:742-743, 1949.

[17] DONALD, H. P.; HANCOCK, J. L. Evidence of a gene-controlled sterility in bulls. *J Agric Sci*, 43:178, 1953.

[18] CHENOWETH, P. J. Characterization of a possible genetic sperm defect (knobbed acrosomes) causing infertility in Angus cattle. Proc. Assoc. Appl Anim Androl, p. 38, 2002.

[19] CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64:457–468, 2005.

[20] THUNDATHIL, J.; MEYER, R.; PALASZ, A. T.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, 54:921-934, 2000.

[21] MEYER, R. A.; BARTH, A. D. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can Vet J*, 42:627, 2001.

[22] JASKOWSKI, L.; ROMANIUK, J. A rare sperm anomaly associated with complete sterility in a bull. *Med Vet*, 15:760, 1959.

[23] HANCOCK, J. L. The morphology of bull spermatozoa. *J Experimental Biology*, 29(3):445- 453, 1952.

[24] MILLER, D. M.; HRUDKA, F.; CATES, W. F.; MARPLETOFT, R. J. Infertility in a bull with nuclear sperm defects: A case report. *Theriogenology*, 17:611-621, 1982.

[25] THUNDATHIL, J.; PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. *et al*. An investigation of the fertility characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 57:35-50, 1999.

[26] SAACKE, R.; NEBEL, R.; KARABINUS, D. *et al*. Sperm transport and accessory sperm evaluation. Proceedings of the 12th Technical Conference on AI and Reproduction, 7, 1988.

[27] KOT, M. C.; HANDEL, M. A. Binding of morphologically abnormal sperm to mouse egg zonae pellucidae *in vitro*. *Gamete Research*, 18(1):57-66, 1987.

[28] BELLVÉ, A. R.; ANDERSEN, E.; HANLEY-BOWDOIN, L. Synthesis and amino acid composition of basis proteins in mammalian sperm nuclei. *Developmental Biology*, 47:349-65, 1975.

[29] BANE, A.; NICANDER, L. Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J Reprod Fertil*, 11:133-138, 1966.

[30] BARTH, A. D. Evaluation of semen quality. Bull Breeding Soudness 3rd Saskatoon: Westerrn Canadian Association of Bovine Practitioners, 41-81, 2013.

[31] BANE, A.; NICANDER, L. Pouch formations by invaginations of the nuclear envelope of bovine and porcine sperm as a sign of disturbed spermiogenesis. *Nordisk Veterinaermedicim*, 17:628-32, 1965.

[32] WITT, A. C.; WITT, G. F.; WITT, F. G. Relación entre la calidad embrionaria y dos cuadros espermáticos de un mismo toro. 4º Simposio Internacional de Reproducción Animal, p.271, Abstract, 2001.

[33] SAACKE, R. G.; DEJARNETTE, J. M.; BAME, J. H. *et al*. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificial inseminated super and single ovulating cattle? *Theriogenology*, 50:117-28, 1998.

[34] CRAN, D.; DOTT, H.; WILMINGTON, J. The structure and formation of rolled and crested spermatozoa. *Gamete Research*, 5: 262-269, 1982.

[35] BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*, 93(2):298-305, 1982.

[36] MAZRIMAS, J. A.; CORZETT, M.; ROD BALHORN. A corrected primary sequences for bull protamine. Biochem. Biophys. Acta, 872(1-2):11-15, 1986.

[37] FUENTES-MASCORRO, G.; SERRANO, H.; ROSADO, A. Sperm chromatin. *Archives of Andrology*, 45(3):215-225, 2000.

[38] EVERSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Fert*, 169:56-75, 2016.

[39] DOBRINSKI, I.; HUGHES, H. P.; BARTH, A. D. Flow cytometer and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J Reprod Fert*, 101:531-8, 1994.

[40] COOPER, A. M.; PEET, R. L. Infertility in a Hereford bull associated with increased numbers of detached sperm heads in his ejaculate. *Australian Veterinary Journal*, 60:225-6, 1983.

[41] BARTH, A. D. Sperm accumulation in the ampola and cauda epididymides of bulls. *Animl Reprod Sci*, 102:238-46, 2007.

[42] JONES, W. Abnormal morphology of the spermatozoa in Guernsey bulls. *British Veterinary Journal*, 118: 257, 1962.

[43] WILLIAMS, G. An abnormality of the spermatozoa of some Hereford bulls. *Vet Rec*, 61:742, 1949.

[44] SEVERO, N. C.; SCHOSSLER, E. Defeitos de peça intermediária e baixa congelabilidade no espermatozoide bovino. X Congr. Brasil. Reprod. Animal, CBRA, Belo Horizonte, p.320, 1993.

[45] SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: Funções, Anormalidades e Outros Fatores que a Influenciam. Campo Grande: EMBRAPA – CNPGC, 128p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 51), 1993.

[46] SWANSON, E. W.; BOYD, L. J. Factors affecting coiled tail spermatozoa in the bull. *Am. J. Vet. Res*., 23:300-9, 1962.

[47] GUSTAFSSON, E. Luminal contents of the bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. *Acta Vet Scand Suppl*, n.17, p.1-80, 1966.

[48] AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl.*,14:397-406, 1993.

[49] HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *International Review of Cytology*, 154:105-189, 1994.

[50] AMANN, R. P.; SEIDEL, G. E.; MORTIMER, R. G. Fertilizing potential *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54:1499-1515, 2000.

[51] SILVA, J. C. B.; POTIENS, J. R.; SILVA, M. R.; NOGUEIRA, E.; de OLIVEIRA, L. O. F.; de ABREU, U. G. P., RODRIGUES, W.; COSTA, D. S. Utilização na IATF de sêmen congelado com incidência alta de patologias espermáticas com taxa satisfatória de concepção: relato de caso. Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) 195, 2017.

[52] BARTH, A. D. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. *Can Vet J*, 30:656-62, 1989.

[53] BIELANSKI, E. Bibliography on spermatozoan morphology in the stallion. *Bibliography of Reprod*, 38:501-96, 1981.

[54] ROBERTS, S. J. Infertility in male animals. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology) 2. ed., Ithaca, NY: published by author; 620 p., 1971.

[55] MORTON, D. B.; BRUCE, S. G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen dogs. *J Reprod Fert*, Supplement, 39;311-6, 1989.

[56] SEVERO, N. C. Ocorrência do defeito inserção abaxial em um touro Jersey. X Congr. Brasil. Reprod. Animal, CBRA, Belo Horizonte, p. 319, 1993.

[57] SAACKE, RG; DALTON, JC; NADIR, S; NEBEL, R L; BAME, JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Anim Reprod Sci, 60-61: 663- 677, 2000.

[58] MOCE, E.; GRAHAM, J. K. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2):104- 118, 2008.

[59] SÁ FILHO, M. F.; GALVÃO, A. L.; AMANCIO, M. J. D.; RODRIGUES, A. D.; MONTEIRO, P. L. J.; GARCIA-DERAGON, L. A. Influencia de la fertilidad del toro en la tasa de preñez de los programas de IATF. XIII Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC, 115-127, 2019.

[60] PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. BMC Syst Biol., 2008, Feb., 22;2:19. doi: 10.1186/1752-0509-2-19. PMID: 18294385; PMCID: PMC2291030.

[61] RAY, P. F.; TOURE, A.; METZLER-GUILLEMAIN, C.; MITCHELL, M. J.; ARNOULT, C.; COUTTON, C. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. Clin Genet, 91217-232, 2017.

[62] TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; SUTOVSKY, P. Identification of genomic variants causing sperm abnormalities and reduced male fertility. *Anim Reprod Sci*, 194:57-62, 2018. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.007

Agradecimentos – a Alta Genetics do Brasil Ltda.

In Memoriam – Dr. Luis Alfredo Garcia-Deragon (1955-2020), um dos fundadores da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) e autor principal deste artigo, pela dedicação à produção e reprodução animal.

Relationships between sperm defects and pregnancy rates

Luis Alfredo Garcia-Deragon[1]
Neimar Correia Severo
ncsevero@gmail.com
Solange Martins Almeida
João Pedro Brandão Zandonaide

Abstract: Almost 100 years of research has tried to suggest minimum standards for the morphological characteristics of bovine sperm and to relate them to fertility both for bulls in natural breeding and in artificial insemination. Predicting the fertility of a bull or a semen match based on laboratory tests is still inaccurate. The diversity of attributes necessary to give the sperm a fertilizing capacity, the heterogeneous constitution of the sperm population in the samples, and the limitations of fertility assessment hinder the possibility of predicting the fertility of a specific semen sample. The limitation of laboratory tests are demonstrative in predicting in vivo fertility in these breeders and reinforces the need for field fertility tests. However, sperm morphology has been the subject of many debates and controversies in research, field practicing, and artificial insemination. Despite the many suggestions for minimum and maximum parameters for major, total, and individual defects, we must consider that, as a result, discussions and suggestions of standards for sperm morphology are always necessary within animal andrology.

Keywords: sperm morphology, fertility, bulls.

Introduction

Pregnancy rates depend on multiple factors. Among them, possibly the most important are: fertility potential of the bull used in insemination or natural breeding, semen quality, body score and female category, herd health, farm, handling during insemination, and inseminator.

The sperm interaction with the cow's reproductive tract after semen deposition has a profound influence on pregnancy rates and provides fundamental issues that have not yet been resolved, despite considerable studies. Fertilizing spermatozoa are selected by the tract among billions or millions of spermatozoa deposited by natural breeding or artificial insemination, but normally only one fertilizes the oocyte. The path that successful spermatozoa take to reach the oocyte is long and tortuous, with a lot of viscous fluid, mucous folds with no way out, and potentially hostile immune cells. The reservoirs release a finite number of stored spermatozoa, acting as a regulator to prevent polyspermia, but still provide an appropriate number of fertile sperm to the upper oviduct. The isthmus epithelium preferably retains

[1] Alta Genetics do Brasil Ltda.

spermatozoa that have intact acrosomes and normal morphology, increasing the probability of an adequate number of fertile spermatozoa where fertilization occurs [1].

Abnormal spermatogenesis can be attributed to specific circumstances that affect the bull, such as extreme climatic conditions, low nutrition, obesity, illnesses with intermittent fever, transport, and adaptation to new environments, having been identified by several Australian authors [2]. Australia works with a considerable number of zebu and crossbred bulls and the Australian Association of Cattle Veterinarians recommends working with a minimum of 70% of normal spermatozoa in the ejaculate as an acceptable quality [3], as well as Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4] .

Regarding sperm morphology, there is a lack of prospective studies designed to accurately assess the relationship between specific characteristics and fertility in the field. This is probably partly due to the degree of the defect that coexists with the number of normal cells suitable for normal fertility [5]. The determination of the percentage of morphologically normal spermatozoa is highly repeatable and is strongly correlated with the days of conception and birth of calves in dairy [6] and beef [7] herds.

Abnormal sperm morphology has long been related to male infertility and the evaluation of abnormalities is essential for the analysis of semen quality [8;9;10]. More recent reports correlating the frequency of morphological defects in the sperm and the fertility of the sample generally agree with the first studies [5;11;12]. The concept of compensable semen defects should be considered when discussing sperm morphology and motility [13].

Morphological alterations that compromise fertility

Acrosome defects

They comprise alterations in the constitution of the acrosomal membrane, formed during the acrosomal phase of spermiogenesis. The acrosome contains multiple enzymes that promote fertilization by degrading the outer membrane of the oocyte's pellucid zone, thus allowing the spermatozoon to penetrate. For optimal fertility, the spermatozoon must have a normal acrosome characterized by a smooth, clear, and uniform surface of the apical crest [14].

Knobbed acrosome

The alteration of the knobbed acrosome may occur in vesicle (vesicular), flattened, or indented shape. The most common appearances in bulls are "flattened or indented" at the apex of the acrosome due to its fold, and can present itself in a very tenuous way, which makes observation difficult, leading to error in counting and underestimation of the problem. It is worth highlighting that the appearance of a "wrinkled and incomplete" acrosome is due to vacuoles in the spermatozoon nucleus.

The cause of the abnormal development of the acrosome can be explained by adverse environmental effects, which is usually presented with other abnormalities, or due to genetic

effects [15;16;17] that suggest a mode of autosomal recessive inheritance [18;19]. Some bulls may have a genetic predisposition to develop the defect in adverse environmental conditions [5]. The defect may manifest itself with other sperm abnormalities in the testicular degenerative processes due to traumatic injury, loss of thermoregulation, and systemic diseases. It generally presents low prevalence, but, in this study's understanding, it should not exceed 10% on the spermiogram. Spermatozoa with a knobbed acrosome defect have a reduced ability to bind to the pellucid zone, so normal spermatozoa can perform fertilization, suggesting that this defect could be considered compensable [20]. It has also been postulated that spermatozoa with flattened or indented acrosomes are less competitive in fertilization than normal spermatozoa [21]. The bull can be sterile if it is very affected [22] or if its fertility is greatly reduced when there is a high incidence of knobbed acrosome defect (83% -89%) in the semen, even if it is in natural breeding [5].

Detached acorosomes

Detached acrosomes can be found in the semen of bulls after long periods of sexual rest and, when exposed to mating, considerably decrease [23]. The process of refrigerating bovine semen at 4ºC can also cause the acrosome to detach.

Head defects

They comprise changes in shape, contour, and size of the sperm head. They are associated with transient or permanent changes in spermatogenesis, resulting from traumatic testicular injuries, heat stress, fever, excessive protein and/or energy in the diet, systemic diseases, prolonged use of corticosteroids, testicular hypoplasias, and may have a genetic origin [19]. Head defects decrease fertility temporarily (subfertility) or permanently (infertility) and are associated with a low rate of cleavage and poor embryonic development.

Pyriform and narrow heads

There is a wide variety of aberrations in the shape of the spermatozoa head of bull semen. Pyriform defect is the most common one and the most classic form presents a practically normal acrosomal region and a narrowed post-acrosomal region. This defect also includes considerable variation in shapes that are slightly smaller in the post-acrosomal region and even ones that are very narrow; they may be found in the same ejaculate, which can make it very difficult to interpret what is normal or altered. Narrow (thin) heads are those in which both regions of the head are narrow, and can sometimes be smaller or elongated. Like the pyriform heads, they also have a wide variation, sometimes making interpretation difficult. Some bulls present spermatozoa shapes that are mostly narrower, which can represent the bull's particular profile and not compromise fertility. Possibly, both shapes, pyriform and narrow, would be the same defect, as long as both have a smaller nucleus.

The development of these defects can occur due to age, have an environmental origin, or genetic factor; some bulls may have a genetic predisposition and the changes may be

present when there are adverse environmental effects. In most cases, pyriform heads appear when there are changes in the normal functioning of testes, such as changes in testicular thermoregulation and in the endocrine system that regulates testicular function. This endocrine alteration may be either local, affecting testicular thermoregulation, or systemic, changing the entire hormonal balance, as, for example, in cases of stress caused by extreme environmental temperature, climate changes, clinical problems, extreme diets, etc. Bulls with testicular hypoplasia and/or smaller testicles tend to have more abnormal head defects [5]. Spermatozoa with head abnormalities can usually have normal acrosomes and good motility, which could allow them to penetrate the pellucid zone and initiate cortical reaction. However, if semen has a high percentage of alterations, fertility will be low.

The impact of pyriform heads on fertility has been well documented. In females subjected to superovulation, a reduction in oocyte fertilization was characterized [24]. In another study [25] with high percentages of pyriform defects and a control group, IVF rates were, respectively, 68.5% and 84.4%. In artificial insemination with synchronized heifers, pregnancy rates were, respectively, 37% and 61%, with embryo and fetal loss rates of 23% and 8% between 22 and 60 days. Pyriform defects interrupt several stages of the fertilization process, including transport [26], penetration of the pellucid zone and attachment to the oocyte [27], and post-fertility events [25].

Nuclear vacuoles (pouch formation, diadem, craters)

Nuclear defects have been described in bulls and other species [28]. The defect is characterized by an invagination of the nuclear membrane inside the nucleoplasm [29]. The causes that have been postulated include stress, disturbance in testicular thermoregulation, viral infections, toxins, and hereditary factors [30]. The incidence varies widely, from 0% to 100% [29], and vacuoles can manifest in single or multiple forms. In bulls, there are usually three forms: a single vacuole at any location of the head, large confluent vacuoles, and multiple vacuoles at the post-acrosomal junction resembling a necklace, known as diadem [31]. In one study, superovulated cows inseminated with semen containing 80% of nuclear vacuoles presented 18% fertilization versus 72% in the control group [24]. A same bull that was subjected to a high energy diet for an exhibition, used in embryo transfer, with 26% and 1% diadem, presented 62% and 6% of degenerate embryos, respectively [32], which clearly demonstrates the effects of environment on spermatogenesis and of sperm alteration on the quality of produced embryos. Spermatozoa with vacuoles can cross the female's reproductive tract and access the oocyte, thus competing in fertilization [33]. The level of vacuoles can dramatically vary in a short period of time for no apparent reason, which suggests a genetic predisposition to the problem. Because of this, bulls with the problem have to be monitored frequently [30].

Macrocephalic and microcephalic

These are the changes that show that the heads are larger or smaller compared to the normal size for the semen of a given bull. They are rare defects and literature has been suggesting

they may have a genetic basis [34]. These spermatozoa are unlikely to be able to participate in fertilization and oocyte development [5]. Giant heads often have curled or crested shapes along the major axis of the head, with several granules, and can be diploid or polyploid [34].

Abnormal DNA condensation

Chromatin is the complex formed by the interaction of proteins of different classes with nuclear DNA in eukaryotic cells. In spermatozoa, chromatin has a complex and very different organization from that of somatic cells. During spermiogenesis, the chromatin of the spermatids undergoes a profound rearrangement and the DNA becomes extremely condensed. This occurs because of two distinct processes: the remodeling of the nuclear matrix of spermatids, which changes the shape from spherical to elongated, and the gradual replacement of histones for protamines, proteins rich in arginine residues, and cysteine. In cattle, protamine 1 (P1) represents between 97% and 99% of all proteins that make up chromatin [35;36;37].

Chromatin stability assessment through the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), protamine deficiency assessment using chromomycin A3 (CMA3), and DNA fragmentation assessed by the COMET assay are the most common tests used to analyze sperm chromatin in many species [38]. A more practical test to access DNA condensation is Feulgen staining, which allows visualization under the microscope [5;39]. The recommendation is a maximum of 20% of changes, but a bull with a history of high fertility showed 34.1% of changes, which indicates the need to further investigate DNA destabilization and assessment systems.

Normal and abnormal detached heads

Ejaculates with high percentages of detached heads were associated with low fertility and sterility [40]. Normal detached heads can occur due to abnormal accumulation of senescent spermatozoa due to lack of transport in the tail of the epididymis and ampullas.This situation seems to be permanent and can be confirmed by collecting from the reproducer again, when the condition will remain the same [41], while abnormal detached heads may occur due to the abnormal formation of the basal plate and/or implantation fossa [30].

Headless spermatozoa

It is a rare hereditary defect resulting in infertility reported in Guernsey [42] and Hereford [43] bulls, in which the majority (80% to 100%) of the spermatozoa were headless. Tails are bent, with droplets, and show motility. The abnormality happens due to a defect in the implantation fossa.

Midpiece defects

They arise from alterations during spermiogenesis, especially between phases 5 and 11 [5]. These types of defects are made up by fractured, naked, coiled (dag defect) and hypoplastic (tail stump) midpieces. Bulls with such defects have low motility and vigor without improvement in subsequent collections, indicating that they result from seminiferous tubules and not from the

sperm maturation process after spermatogenesis. These defects occur because of the loss and/or disorganization of the bundles of internal fibers and mitochondria located in the region of the initial portion of the sperm flagellum. The presence of small flaws in the mitochondrial sheath of the spermatozoa, associated with the midpiece fracture, caused a decrease in the motility of the post- frozen semen in an imported Angus bull [44]. In the exhaustion test, the samples of the ejaculates did not present a significant reduction in sperm pathology, suggesting a possible testicular origin.

Tail defects

Tail defects are the most common ones in bovine spermiogram, with a high frequency of up to 97% [45] and a varied incidence from 23% to 25% [46;47]. Different types of tail defects have been recorded in the literature, in which the most common are simple bent tail, bent tail with droplet, and strongly bent or coiled, which are considered as different manifestations of the same problem and called "distal midpiece reflex"(DMR) [5]. This alteration usually occurs when spermatozoa are in the body and/or tail of the epididymis, retaining the cytoplasmic droplet in the bending of the tail. The incidence of the defect increases when the spermatozoa pass through the vas deferens and reach maximum alterations in the ampullas.

Generally, tail defects accompany testicular degenerative processes in conjunction with other defects, such as head, acrosome, proximal cytoplasmic droplet, and midpiece defects. Bulls with testicular hypoplasia tend to have a higher prevalence of tail defects or those with epididymal alterations due to the hyposmotic environment in the epididymal tubule [48]. Tail defects are also present in the inflammatory processes of vesicular adenitis, ampullas of the vas deferens, and in epididymitis.

Proximal cytoplasmic droplet (PCD)

This defect originates in the final stages of spermiogenesis and refers to the maintenance of residual bodies from the organelles that make up the spermatids cytoplasm [49]. Although it is indicative of a degenerative process in adult bulls, it can be found in young, still pubescent, bulls. In these animals, it is recommended to perform a new exam if there is more than 20% of proximal cytoplasmic droplet. It is also associated with a decrease in sperm motility and vigor. Its percentages are very variable in bulls with testicular degeneration and are generally nonspecific. It may occur both at the beginning and at the end of the degenerative process. However, its permanence in new exams shows an unfavorable prognosis for reproductive fitness. A number above 15% on the spermiogram induces a decrease in fertilization and embryonic development rates [50]. In young animals, the presence of PCD is associated with a lack of sexual maturity and, in adult animals with normal fertility, the frequency is low, approximately 2.7%.

Compensable and uncompensable defects

The description of compensable and non-compensable defects is relevant in the current context. Compensable defects are those that compromise the arrival of the sperm

to the oocyte or penetration into its pellucid zone (midpiece, tail, and acrosome defects), whereas uncompensable defects are those that can initiate fertilization, but compromise the quality of the embryo and the maintenance of pregnancy (head, diadem, vacuoles defects) [13].

Considering the fertilization capacity of an ejaculate, nuclear abnormalities should not be tolerated beyond 15% to 20% of total spermatozoa; acrosome or tail abnormalities, which do not interfere with the ability of other normal cells to fertilize the oocyte, could be tolerated up to 25%, in accordance with a standard of at least 75% of normal spermatozoa in the ejaculate [5].

The report of a case described in Silva *et al* [51] of a Nellore bull with an acquired clinical problem (unilateral orchitis caused by trauma), used in FTAI (3,243 Nelore females) with satisfactory pregnancy results, may be a good example of "compensable defects ". The semen was processed with high sperm pathology (higher than 37%, total 49%), with a total of 30 million spermatozoa, from which 10 million were viable. Among the largest defects (37%), 23% could be compensable (3% with a strongly bent tail; 2% with a pathological detached head; 11% with a midpiece fracture; 7% with a bent tail with droplet); and in minor defects (12%), 9% could be compensable (2% with a normal detached head and 7% with a bent tail).

Morphological changes that do not compromise fertility

Distal cytoplasmic droplets (DCD)

Located near the *annulus*, the DCD usually detaches from the sperm tail when it is mixed with the seminal fluid at ejaculation. When semen with a high percentage of distal droplets was incubated for 15 to 30 minutes or the sample was gently shaken, the droplets were released from the spermatozoa [5]. The presence of a high percentage of distal droplets in the ejaculate has not been related to low fertility in natural breeding when it is not associated with other sperm alterations [5]. In artificial insemination, bulls with a high percentage of distal droplets had similar return rates to bulls with a low percentage of DCD [12].

Abaxial tail implantation

In bulls, abaxial implantation without alterations in midpiece or tail does not reduce fertility and, therefore, should be considered as a normal variation in semen [5;52]. It is also not considered an abnormality in stallions [53], boars [54], and dogs [55]. In an imported Jersey bull, donor of semen, a percentage of abaxial spermatozoa was found on average of 17.8% in the ejaculate, with a variation between 5% to 38%, in 54 collected ejaculates, whose physical characteristics were normal. Submitted to the field fertility test on a property with controlled insemination, there was no significant difference in fertility rates, with 69% pregnancy rate, while the average on the property did not exceed 64% [56]. This experiment demonstrated that abaxial implantation not associated with other changes in midpiece and tail does not reduce fertility in the bull.

Final Considerations

In general, studies show that bulls with high seminal quality have better fertility rates than those of low quality. This inaccurate relationship between seminal characteristic and fertility makes it difficult to demonstrate small variations in the fertility of individuals with high seminal quality used in both artificial insemination and natural breeding. Because of that, the definition of seminal quality indicators and, mainly, the establishment of limits or standards for its evaluation are still extensively studied and constitute the main question regarding the relationship with the male's potential fertility [57].

Predicting the fertility of a bull or a semen batch based on laboratory tests still generates inaccuracy. The diversity of attributes necessary to give spermatozoa fertilizing capacity, the heterogeneous constitution of the spermatozoa population in the samples, and the limitations of fertility evaluation make it difficult to predict the fertility of a given semen sample [58].

The evaluation of the spermiogram must be performed by those who understand normal and abnormal spermatogenesis, as well as the normal and abnormal sperm ultrastructure. Even with all the advances and technologies used in semen analysis and quality control, there is still variation in fertility among bulls approved by the quality control of artificial insemination centers. This demonstrates the limitation of laboratory tests in predicting *in vivo* fertility in these breeders and reinforces the need for field fertility tests [59].

Possibly, in the coming years, studies on seminal proteins (proteomics) [60] and on the relationship of defects with genetic markers (genomics) [61;62] may change the current situation regarding the need for field tests to evaluate the fertility of bulls.

The manual by Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [4], published in 2013, points out suggestions for minimum parameters for total and individual major defects that are rigorous and no scientific support was found for such a definition. Because of that, it is understood that the discussion and suggestion of minimum standards is necessary in animal andrology.

References

[1] TEIJEIRO, J. M.; MARINI, P. E. Apical membranes prepared by peeling from whole porcine oviducts interact with homologous sperm. *Cell and Tissue Research*, 348:213–223, 2012.

[2] HOLROYD, R. G.; FORDYCE, G.; BERTRAM, J. D.; FITZPATRICK, L. A.; DOOGAN, V. J.; TURNER, L. D.; MCGOWAN, M. R. Uso y evaluacion de toros Bos indicus en condiciones de manejo extensivas y semi-extensivas: un resumo de las atividades en el norte de Australia. 4° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Cordoba, Argentina, p.9-24, 2001.

[3] MCGOWAN, M.; GALLOWAY, D.; TAYLOR, E.; ENTWISTLE, K.; JOHNSTON, P. The Veterinary Examination of Bulls. Australian Association of Cattle Veterinarians, PO Box 34, Indooroopilly, Qld 4068, 1995.

[4] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3ed. Belo Horizonte, 2013.

[5] BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 285 p, 1989.

[6] NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; WAHLSTEN, T.; LJEAS, R.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology*, 79:1153-61, 2013.

[7] HOLROYD, R. G.; DOOGAN, W.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D. Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Anim Reprod Sci*, 71:67-79, 2002.

[8] WILLIAMS, W. W.; SAVAGE, A. Observations on the seminal micropathology of bulls. *Cornell Vet*, 15:353-375, 1925.

[9] LAGERLÖF, N. Morphological studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Copenhagem, v. 19, p. 245-266, 1934.

[10] BLOM, E. Interpretation of spermatic citology in bulls. *Fertil Steril*, 1:223-238, 1950.

[11] SAACKE, R. G. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. In Proceedings of the 3rd Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, NAAB, Chicago, IL, USA, p. 17–29, 1970.

[12] AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology*, 70:682–691, 2008.

[13] SAACKE, R. G. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*, 70, 473–478, 2008.

[14] LUNSTRA, D. D.; ECHTERNKAMP, S. E. Puberty in beef Bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J Anim Sci*, 55:638-48, 1982.

[15] ROLLINSON, D. H. L.; MAKINSON, J. B. Evidence of an inherited seminal character of semen from associated with infertility of Friesian bulls. *Vet Res*, 61:373, 1949.

[16] HANCOCK, J. L. Evidence of and inherited seminal character associated with infertility of Friesian bulls. *Vet Rec*, 61:742-743, 1949.

[17] DONALD, H. P.; HANCOCK, J. L. Evidence of a gene-controlled sterility in bulls. *J Agric Sci*, 43:178, 1953.

[18] CHENOWETH, P. J. Characterization of a possible genetic sperm defect (knobbed acrosomes) causing infertility in Angus cattle. Proc. Assoc. Appl Anim Androl, p. 38, 2002.

[19] CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64:457–468, 2005.

[20] THUNDATHIL, J.; MEYER, R.; PALASZ, A. T.; BARTH, A. D.; MAPLETOFT, R. J. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. *Theriogenology*, 54:921-934, 2000.

[21] MEYER, R. A.; BARTH, A. D. Effect of acrosomal defects on fertility of bulls used in artificial insemination and natural breeding. *Can Vet J*, 42:627, 2001.

[22] JASKOWSKI, L.; ROMANIUK, J. A rare sperm anomaly associated with complete sterility in a bull. *Med Vet*, 15:760, 1959.

[23] HANCOCK, J. L. The morphology of bull spermatozoa. *J Experimental Biology*, 29(3):445- 453, 1952.

[24] MILLER, D. M.; HRUDKA, F.; CATES, W. F.; MARPLETOFT, R. J. Infertility in a bull with nuclear sperm defects: A case report. *Theriogenology*, 17:611-621, 1982.

[25] THUNDATHIL, J.; PALASZ, A. T.; MAPLETOFT, R. J. *et al*. An investigation of the fertility characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 57:35-50, 1999.

[26] SAACKE, R.; NEBEL, R.; KARABINUS, D. *et al*. Sperm transport and accessory sperm evaluation. Proceedings of the 12th Technical Conference on AI and Reproduction, 7, 1988.

[27] KOT, M. C.; HANDEL, M. A. Binding of morphologically abnormal sperm to mouse egg zonae pellucidae *in vitro*. *Gamete Research*, 18(1):57-66, 1987.

[28] BELLVÉ, A. R.; ANDERSEN, E.; HANLEY-BOWDOIN, L. Synthesis and amino acid composition of basis proteins in mammalian sperm nuclei. *Developmental Biology*, 47:349-65, 1975.

[29] BANE, A.; NICANDER, L. Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J Reprod Fertil*, 11:133-138, 1966.

[30] BARTH, A. D. Evaluation of semen quality. Bull Breeding Soudness 3rd Saskatoon: Westerrn Canadian Association of Bovine Practitioners, 41-81, 2013.

[31] BANE, A.; NICANDER, L. Pouch formations by invaginations of the nuclear envelope of bovine and porcine sperm as a sign of disturbed spermiogenesis. *Nordisk Veterinaermedicim*, 17:628-32, 1965.

[32] WITT, A. C.; WITT, G. F.; WITT, F. G. Relación entre la calidad embrionaria y dos cuadros espermáticos de un mismo toro. 4º Simposio Internacional de Reproducción Animal, p.271, Abstract, 2001.

[33] SAACKE, R. G.; DEJARNETTE, J. M.; BAME, J. H. *et al*. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificial inseminated super and single ovulating cattle? *Theriogenology*, 50:117-28, 1998.

[34] CRAN, D.; DOTT, H.; WILMINGTON, J. The structure and formation of rolled and crested spermatozoa. *Gamete Research*, 5: 262-269, 1982.

[35] BALHORN, R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*, 93(2):298-305, 1982.

[36] MAZRIMAS, J. A.; CORZETT, M.; ROD BALHORN. A corrected primary sequences for bull protamine. Biochem. Biophys. *Acta*, 872(1-2):11-15, 1986.

[37] FUENTES-MASCORRO, G.; SERRANO, H.; ROSADO, A. Sperm chromatin. *Archives of Andrology*, 45(3):215-225, 2000.

[38] EVERSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Fert*, 169:56-75, 2016.

[39] DOBRINSKI, I.; HUGHES, H. P.; BARTH, A. D. Flow cytometer and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J Reprod Fert*, 101:531-8, 1994.

[40] COOPER, A. M.; PEET, R. L. Infertility in a Hereford bull associated with increased numbers of detached sperm heads in his ejaculate. *Australian Veterinary Journal*, 60:225-6, 1983.

[41] BARTH, A. D. Sperm accumulation in the ampola and cauda epididymides of bulls. *Animl Reprod Sci*, 102:238-46, 2007.

[42] JONES, W. Abnormal morphology of the spermatozoa in Guernsey bulls. *British Veterinary Journal*, 118: 257, 1962.

[43] WILLIAMS, G. An abnormality of the spermatozoa of some Hereford bulls. *Vet Rec*, 61:742, 1949.

[44] SEVERO, N. C.; SCHOSSLER, E. Defeitos de peça intermediária e baixa congelabilidade no espermatozoide bovino. X Congr. Brasil. Reprod. Animal, CBRA, Belo Horizonte, p.320, 1993.

[45] SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade Reprodutiva do Touro de Corte: Funções, Anormalidades e Outros Fatores que a Influenciam. Campo Grande: EMBRAPA – CNPGC, 128p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 51), 1993.

[46] SWANSON, E. W.; BOYD, L. J. Factors affecting coiled tail spermatozoa in the bull. *Am. J. Vet. Res.*, 23:300-9, 1962.

[47] GUSTAFSSON, E. Luminal contents of the bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. *Acta Vet Scand Suppl*, n.17, p.1-80, 1966.

[48] AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl.*,14:397-406, 1993.

[49] HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. International Review of Cytology, 154:105-189, 1994.

[50] AMANN, R. P.; SEIDEL, G. E.; MORTIMER, R. G. Fertilizing potential *in vitro* of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. *Theriogenology*, 54:1499-1515, 2000.

[51] SILVA, J. C. B.; POTIENS, J. R.; SILVA, M. R.; NOGUEIRA, E.; de OLIVEIRA, L. O. F.; de ABREU, U. G. P.; RODRIGUES W.; COSTA, D. S. Utilização na IATF de sêmen congelado com incidência alta de patologias espermáticas com taxa satisfatória de concepção: relato de caso. Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) 195, 2017.

[52] BARTH, A. D. Abaxial tail attachment of bovine spermatozoa and its effect on fertility. *Can Vet J*, 30:656-62, 1989.

[53] BIELANSKI, E. Bibliography on spermatozoan morphology in the stallion. *Bibliography of Reprod*, 38:501-96, 1981.

[54] ROBERTS, S. J. Infertility in male animals. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology) 2nd ed., Ithaca, NY: published by author; 620 p., 1971.

[55] MORTON, D. B.; BRUCE, S. G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen dogs. *J Reprod Fert*, Supplement, 39;311-6, 1989.

[56] SEVERO, N. C. Ocorrência do defeito inserção abaxial em um touro Jersey. X Congr. Brasil. Reprod. Animal, CBRA, Belo Horizonte, p.319, 1993.

[57] SAACKE, R. G.; DALTON, J. C.; NADIR, S.; NEBEL, R. L.; BAME, J. H. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim Reprod Sci*, 60-61: 663- 677, 2000.

[58] MOCE, E.; GRAHAM, J. K. *In vitro* evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci*, 105(1-2):104- 118, 2008.

[59] SÁ FILHO, M. F.; GALVÃO, A. L.; AMANCIO, M. J. D.; RODRIGUES, A. D.; MONTEIRO, P. L. J.; GARCIA-DERAGON, L. A. Influencia de la fertilidad del toro en la tasa de preñez de los programas de IATF. XIII Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC, 115-127, 2019.

[60] PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Syst Biol.*, 2008, Feb., 22;2:19. doi: 10.1186/1752-0509-2-19. PMID: 18294385; PMCID: PMC2291030.

[61] RAY, P. F.; TOURE, A.; METZLER-GUILLEMAIN, C.; MITCHELL, M. J.; ARNOULT, C.; COUTTON, C. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin Genet*, 91217-232, 2017.

[62] TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; SUTOVSKY, P. Identification of genomic variants causing sperm abnormalities and reduced male fertility. *Anim Reprod Sci*, 194:57-62, 2018. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.007.

Acknowledgements – Alta Genetics do Brasil Ltda.

In Memoriam – Dr. Luis Alfredo Garcia-Deragon (1955-2020), one of the founders of Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA) and main author of this article, for his dedication to animal production and reproduction.

Resumos

Reunião Anual da

V ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

Condicionamento de reprodutores bubalinos para coleta e congelamento de sêmen na propriedade

Jaci de Almeida[1]
jaciveterinariorj@gmail.com
Osvaldo Almeida Resende[2]

Abstract: Reproductive seasonality, the difficulty of finding semen in the national market and in some cases the lack of behavioral knowledge of the buffalo bulls involved in the process of handling, conditioning, collecting and freezing semen are some of the factors that contribute to the low percentage of AI use. In this context, the objective of the study was to present results of conditioning and semen collection of buffaloes with artificial vagina on the farm.

Keywords: comportamento; touros; vagina artificial.

Palavras-chave: behavior; bulls; artificial vagina.

Introdução - A maior parte do rebanho bubalino brasileiro se reproduz através da monta natural a campo, e segundo dados do IBGE [1], somente cerca de 1% das fêmeas bubalinas em idade reprodutiva são submetidas a inseminação artificial, como biotecnia de multiplicação animal. No entanto, este percentual deve ser um pouco maior devido ao grande crescimento da utilização da IATF na espécie, nos últimos anos. Apesar disto, ainda são poucas as pesquisas relacionadas ao desempenho reprodutivo dos touros utilizados em sistemas de manejo reprodutivo de monta natural a campo. Isto se deve principalmente à sazonalidade reprodutiva, característica fisiológica da espécie; ao pequeno número de reprodutores com qualidade genética disponíveis; reduzido número de búfalos em coleta para congelamento de sêmen nas Centrais Comerciais, ocasionando falta de sêmen no mercado nacional, situação que se agrava pela proibição de importar animais de países da Ásia e Itália, que apresentam bubalinocultura mais avançada [2]. Alguns dos motivos, que explicariam essa dificuldade no manejo e coleta dos touros bubalinos, são conhecidos a várias décadas. Porém persistem até o momento atual: a) relatos de que touros bubalinos mesmo condicionados à coleta com vagina artificial convencional em Centrais, se tornaram resistentes ao serviço artificial ao longo do tempo [3; Bernardes, 2017 - comunicação pessoal], dificultando e tornando inviável economicamente a sua manutenção em centrais de congelamento de sêmen. b) durante a coleta de sêmen, os animais são estimulados sexualmente de tal forma que as atividades prematórias (cortejo e reconhecimento da fêmea em cio) podem ser ignoradas para produzir o número desejado de ejaculações, no menor tempo possível [4] e c), machos desta espécie não manterem uma regularidade de ejaculados com qualidade, que permitam o congelamento por várias semanas seguidas, havendo várias coletas alternadas de sêmen com e sem qualidade para o congelamento

[1] Universidade Santa Úrsula-USU.
[2] Embrapa Agrobiologia, RJ.

e mesmo interrupção nas ejaculações sem motivo aparente. O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento sexual e as características de condicionamento de reprodutores bubalinos submetidos à coleta de sêmen com vagina artificial para congelamento de sêmen em fazendas.

Material e Métodos - O experimento foi realizado na Fazenda Indiana, no município de São Sebastião do Passé/BA, Brasil, Latitude 12°30'45" Sul e Longitude 38º29'43" Oeste [5]. Algumas recomendações foram repassadas ao proprietário, tais como: evitar vacinar, vermifugar, usar medicamentos carrapaticidas, alimentação contendo uréia e gossipol nos 60 dias, que antecederiam as coletas. Assim como, os animais serem condicionados no local definitivo de coletas com vagina artificial, e por último, não menos importante, separar os touros das fêmeas, argolar e manejar em local onde eles fossem se acostumando com a presença visual de outros reprodutores. Foram utilizados sete touros Murrah (*Bubalus bubalis*) da própria fazenda, durante o período reprodutivo desfavorável (PRD - primeira quinzena de março de 2019), com a idade de 5,8 a 17,9 anos; pesos de 660 a 900kg; ECC de 3 a 4 e PE de 36 a 40 cm, criados em sistema extensivo e com experiência sexual com fêmeas. Os reprodutores apresentavam histórico de fertilidade conhecida e eram manejados separados das fêmeas, sendo selecionados a partir de pré-condicionamento para coleta com vagina artificial e qualidade dos ejaculados seguindo recomendação do Manual de Andrologia [6]. Uma fêmea em cio natural ou induzido era contida em tronco específico para as coletas na parte da manhã, tarde e noite. Após as coletas, os ejaculados eram direcionados para o laboratório e colocados em banho-maria a 37°C, para as análises das características físicas (volume, turbilhão, motilidade, vigor e concentração) e morfológicas (defeitos maiores, menores e totais) do sêmen, usando microscopia de contraste de fase e eosina. O tempo mínimo de 15 minutos foi estipulado para que o animal executasse a cópula [7]. Também foi criada uma tabela, onde se anotavam os tipos e números de sinais manifestados pelos reprodutores (cheirar urina no solo, cheirar vulva, lamber vulva, reflexo de Flehmen, coçar a cabeça na fêmea, dar cabeçada na fêmea, apoiar o queixo na garupa da fêmea, contração peniana intermitente antes da monta, exposição do pênis e monta incompleta sem exposição do pênis) apresentados pelo animal durante o período de avaliação estipulado. A coleta foi realizada com vagina artificial [6], com temperatura interna de 42°C. Para cada coleta foi induzida uma falsa monta na primeira tentativa (sem coleta de sêmen, com intuito de aumentar a concentração espermática do ejaculado), sendo o ejaculado da segunda monta coletado e direcionado para o laboratório, colocado em banho-maria a 37°C, para as análises. Para as análises foram realizadas estatística descritiva, correlação e regressão logística multinível utilizando as variáveis respostas e explicativas descritas acima, sendo estas controladas pelo touro, a variância do touro foi controlada como uma variável aleatória e testada segundo o teste de Wald. Os touros (n=7) tiveram 15 momentos de acompanhamento, sendo realizado um modelo com todas as observações [8].

Resultados e Discussão - As frequências médias dos eventos relacionados ao comportamento sexual de 7 touros bubalinos, observadas durante o período reprodutivo favorável, foram estudadas em uma propriedade particular (Tabela 1). Assim como, as correlações entre os parâmetros de comportamento sexual, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1- Frequências médias(x) e desvio padrão(dv) dos eventos relacionados ao comportamento sexual de touros bubalinos (n=7), durante condicionamento para coletas de sêmen com vagina artificial por até 15 minutos (15 sessões/animal), na estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão) de 2019.

Parâmetros	X/dv
1 - Cheirar urina no solo	1,36±0,06
2 - Cheirar vulva da fêmea	2,26±0,06
3 - Lamber vulva	3,18±0,09
4 - Reflexo de Flehmen	1,78±0,05
5 - Coçar a cabeça no posterior da fêmea	1,55±0,08
6 - Dar cabeçada na fêmea	1,05±0,07
7 - Apoiar o queixo no dorso posterior da fêmea	0,82±0,06
8 - Contração peniana	6,19±0,20
9 - Exposição incompleta do pênis	0,90±0,06
10 - Monta incompleta sem exposição do pênis	0,75±0,06
11 - Ejaculação no solo sem salto;	0,07±0,02
12 - Ejaculação completa	0,89±0,04
13 - Volume (mL)	1,98±0,12

Nas primeiras tentativas de coleta de sêmen, houve maior número de atos de cheirar urina e/ou lamber a vulva e reflexo de Flehmen, que diminuiu com o passar do tempo, a medida que o animal foi exposto várias vezes à fêmea em cio. Sugerindo que inicialmente, o touro identifica o *status* reprodutivo da fêmea por meio desses três eventos. No entanto, quando vários touros eram expostos as tentativas de coleta sequencialmente e urinavam próximo a fêmea durante o cortejo sexual, ocasionava um tempo maior de identificação do resíduo de urina no chão pelos touros que eram apresentados a fêmea na sequência. Isto em parte fez com que os animais demandassem um tempo maior para realizar os saltos e tentativas de cópula.

Observou-se também, que os touros realizaram serviços completos, durante todo os horários testados (manhã, tarde e noite), no entanto, a maioria dos animais responderam melhor nas primeiras horas da manhã, sendo este o horário eleito para a realização das tentativas de coleta.

Tabela 2 - Coeficientes de correlações lineares fenotípicas entre as características de comportamento sexual em touros bubalinos (n=7), adultos, submetidos a coleta de sêmen com vagina artificial durante a estação reprodutiva desfavorável (primavera e verão) no ano de 2019.

Parâmetros	Cheirar urina no solo	Cheirar vulva	Lamber vulva	Reflexo de Flehmen	Coçar a cabeça na ♀	Dar cabeça-da na ♀	Apoiar o queixo no dorso da ♀	Contração peniana	Exposição incom-pleta do pênis	MI sem exposi-ção do pênis	Ejaculação no solo s/ salto	Ejaculação completa	Volume (mL)
Cheirar urina no solo	1,0000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cheirar vulva	0,3443***	1,0000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Lamber vulva	0,3245***	0,6197***	1,0000	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Reflexo de Flehmen	0,2374***	0,2433***	0,3045***	1,0000	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Coçar a cabeça na ♀	0,2644***	0,2518***	0,3207***	0,1672*	1,0000	---	---	---	---	---	---	---	---
Dar cabeçada na ♀	0,3411***	0,2198**	0,1936**	0,2308***	0,6601***	1,0000	---	---	---	---	---	---	---
Apoiar o queixo no dorso da ♀	0,2680***	0,1752*	0,0730ns	0,2247**	0,3560***	0,5165***	1,0000	---	---	---	---	---	---
Contração peniana	0,3205***	0,4441***	0,4991***	0,3106***	0,2684***	0,2156**	0,2871***	1,0000	---	---	---	---	---
Exposição incompleta do pênis	0,2848***	0,1679*	0,1464**	0,2692***	0,0418ns	0,1668*	0,2780***	0,3567***	1,0000	---	---	---	---
MI sem exposição do pênis	0,0929ns	0,0890ns	0,0985ns	0,1815**	0,0463ns	0,1276ns	0,2560***	0,3131***	0,3469***	1,0000	---	---	---
Ejaculação no solo sem salto	0,1147ns	0,2119**	0,1624*	0,0494ns	0,3445***	0,3167***	0,2482***	0,3724***	0,2670***	0,2577***	1,0000	---	---
Ejaculação completa	0,1838**	0,1940**	0,2367***	0,1787*	-0,0184ns	0,0311ns	0,1167ns	0,3276***	0,1886**	0,1344ns	0,0772ns	1,0000	---
Volume (mL)	0,1951**	0,2114**	0,3264***	0,1505*	0,0686ns	0,0085ns	0,0548ns	0,3739***	0,1389*	0,1589*	0,1162ns	0,7312***	1,0000

ns: Não significativo; *: baixa correlação (P<0,05); **: moderada correlação (P<0,01).; ***: alta correlação (P<0,001); MI: Monta Intencional e ♀: fêmea.

Durante os horários mais quentes do dia, os animais tiveram menor interesse em saltar erealizar os serviços completos, indicando possivelmente, sentirem mais os efeitos das altas temperaturas e comportamento de poupar energia.

Os resultados médios para as características físicas do sêmen (volume, motilidade, vigor e concentração) e morfológicas (defeitos maiores, menores e totais) foram 1,9±0,7 mL; 76,9±10,2%; 3,3±0,6 pontos (escore de 1 a 5); 7,5±1,0%; 14,2±2,6% e 21,7±3,1%, respectivamente.

Na tabela 2 é possível verificar as correlações feitas para o comportamento sexual de 7 touros bubalinos, durante o PRD de avaliação, submetidos a 15 tentativas de coleta de sêmen, indicando que a conduta sexual do macho não pode ser mensurada por apenas um parâmetro. Essas relações de comportamento sexual juntamente com a qualidade do sêmen têm grande significado para prever a qualidade e a fertilidade dos touros [9]. Assim quando utilizados mais de três parâmetros associados a coleta de sêmen com vagina artificial, já se verifica um aumentode 9,0% na chance de obter um ejaculado. Percentual superior 28,2% quando se observa entresete e nove parâmetros por animal durante a coleta com vagina artificial [2]. Essas observaçõesindicam que as características de comportamento sexual são dependentes.

Em relação às variáveis entre os parâmetros mencionados que estão associados a probabilidade de haver ejaculação, aumentou em 1,2 pontos a chance de se obter um ejaculado quando passamos de até seis parâmetros avaliados para sete a nove, demostrando uma relação de quantidade-resposta [2]. Segundo Anzar *et al.* [10] com as mudanças ocorridas no sistema de manejo e criação dos búfalos (passando de extensiva para semi-confinamento e confinamento em menor escala), ocasionaram algumas mudanças no comportamento dos animais, principalmente pelo fato de os reprodutores ficarem contidos em piquetes, baias e mesmo preso por cordas. Desta forma certos comportamentos sexuais foram modificados (sejamno tempo para execução ou mesmo o tipo de comportamanto e sua intensidade de repetições).

Considerações Finais - Os reprodutores bubalinos são passíveis de condicionamento para coleta de sêmen com vagina artificial em suas fazendas de origem. Após doze sessões de tentativas de coleta seminal, os touros já respondem com uma certa regularidade a coleta de sêmen com o método de vagina artificial. De todos os eventos estudados, a contração peniana,foi o de maior importância na conduta sexual dos touros bubalinos, demonstrado pelas elevadasproporções de manifestação em relação a todos os comportamentos sexuais expressos, na presença de fêmea em estro. Para nenhum dos eventos estudados individualmente foi observado um padrão temporal e homogêneo de expressão em relação à presença da fêmea em estro.

Referências bibliográficas

[1] IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. http://www.ibge.gov.br/home, 2013.

[2] Almeida, J. Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial de búfalas (*Bubalus bubalis*). 2018. 195p. Cap.1. Particularidades do condicionamento de touros Bubalinos em coleta de sêmen com vagina artificial convencional para uso em estações reprodutivas favorável e desfavorável. p. 84-97. Tese (Doutorado) - UFMG, Belo Horizonte, MG.

[3] Prabhu, S. S.; Bhattacharya, P. Influence of factors affecting sex drive on semen production of buffaloes. I - Physiological state of the "teaser" cow. *Indian J Vet Sci Anim Husband*, 1954:5-50.

[4] Mader, D. R., Price, E. O. Effect of sexual stimulation on the sexual performance of Hereford bulls. *J. Anim. Sci.*, v. 59, p. 294-300, 1984.

[5] https://www.geografos.com.br/cidades-bahia/sao-sebastiao-do-passe.php 2019.

[6] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3. ed. Belo Horizonte; 2013.

[7] Vale, W. G. Avances biotecnológicos em reproducción de búfalos. *Tecnología em Marcha.* Rev. Esp., v. 24, n. 5, p. 89-90, 2011.

[8] Dohoo, I. R.; Martin, W.; Stryhn, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2. ed. Charlottetown, Canadá: University of Prince Edward Island, 2010.

[9] Singh, S.; Bhakat, M.; Mohanty, T.K.; Kumar, A.; Gupta, A. K.; Chakravarty, A. K.; Singh, P. Sexual behavior and its relationship with semen quality parameters in Sahiwal breeding bulls. *Veterinary World*, v.8, n.6, p.745-749, Jun. 2015.

[10] Anzar, M.; Ahmad, M.; Nazir, M.; Ahmad, N.; Shah, I. H. Selection of buffalo bulls: sexual behavior and its relationship to semen production and fertility. *Theriogenology,* v. 40, p. 1187-1198, 1993.

Uso de diferentes diluidores intracelulares na criopreservação de sêmen de jumentos da raça Pêga

Leonardo José Campos Jr.[1]
Victoria Kanadani Campos Poltronieri[1]
victoria.poltronieri@ufv.br
Faider Alberto Castanõ Villadiego[1]
Jurandy Mauro Penitente Filho[1]
Ytalo Galinari Henriques Schuartz[1]
Iara Magalhães Ribeiro[1]
José Domingos Guimarães[1]
jdguima@ufv.br

Abstract: The growing demand for donkeys with high genetic potential makes it necessary to develop biotechnologies applied to reproduction, in order to maximize the productivity of commercial farms and the diffusion of artificial insemination biotechnology in such species. Due to the low fertility observed in donkeys inseminated with cryopreserved semen, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* sperm viability of frozen semen in extender containing glycerol or alternative cryoprotectants (Ethylene glycol, Dimethylformamide and associations). Fifteen ejaculates from three Pêga donkeys were frozen. Assessments of total sperm motility and vigor in the pre-freeze and post-thaw times were performed. The association of cryoprotectants ethylene glycol (2%) and dimethylformamide (2%) proved to be more promisingas a constituent of freezing extenders for cryopreservation of donkey semen *in vitro*, although more in vivo tests are necessary.

Keywords: *Asinine, biotechnology, cryoprotectants.*

Palavras-chave: Asininos, biotecnologia, crioprotetores.

Introdução- Asininos, em especial da raça Pêga, vem sendo cada vez mais valorizados no Brasil, em função da visível melhora nos padrões zootécnicos e ganho em seu potencial genético. Além disso, a produção de muares de qualidade para o trabalho em áreas rurais tem sido cada vez mais requerida, devido sua força física e extrema resistência a cargas pesadas de trabalho[5]. Visando maximizar o progresso genético, técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e clonagem tem sido aplicadas em equídeos. O aumento na produção de animais geneticamente superiores, transporte de gametas e embriõesa longas distâncias, utilização de animais sub-férteis e a preservação material genético de animais valiosos ou de raças sob risco de extinção são exemplos alcançados com as biotécnicas[12, 6, 1]. Nesse contexto, o sêmen criopreservado é a biotecnologia mais utilizada paraa otimização do melhoramento genético animal, por contribuir efetivamente para o

[1] Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa – MG, Brasil.

aumento da produtividade das principais espécies domésticas[3]. Porém, a simples transferência de tecnologias desenvolvidas em determinada espécie para outra raramente gera resultados satisfatórios, uma vez que as diferenças fisiológicas existem até mesmo entre espécies similares[16]. Tal fato explica o que ocorre entre equídeos: os protocolos de congelamento de sêmen utilizados em equinos resultam em baixas taxas de gestação em asininos[14] quando comparado com o uso de sêmen fresco ou refrigerado.

Postula-se que o glicerol, o crioprotetor mais comumente utilizado na criopreservação de sêmen equino, seja tóxico para os espermatozoides de asininos[13] ou exerça efeito negativo direto no órgão genital das fêmeas da espécie. Esta hipótese é fundamentada em resultados descritos por Vidament *et al*. (2009), em que as taxas de gestação foram maiores em éguas quando comparadas a jumentas inseminadas com sêmen de jumentos congelados com glicerol a 2,5 % (36 e 11 %, respectivamente). Embora sejam escassos os estudos acerca do efeito do glicerol na fertilidade *in vivo* de jumentas inseminadas com sêmen congelado de jumentos, as taxas de gestação descritas na literatura são insatisfatórias (0 a 20 %). O uso de crioprotetores alternativos e a diluição pós-descongelamento do glicerol são objeto de estudos, visando o desenvolvimento de novas metodologias para que sejam atendidas eficientemente as crescentes demandas produtivas na espécie asinina. Dessa forma, objetivou-se com o presente trabalho avaliar os parâmetros de qualidade seminal de partidas congeladas de sêmen de jumentos em meios contendo glicerol (GL) ou dimetilformamida (DF) associada ou não ao etilenoglicol (ET).

Material e Métodos - Três jumentos da raça Pêga provenientes do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG (latitude 20º 45'20" Sul, longitude 42º 52'53" Oeste, altitude média de 752 m) foram utilizados. Todos os animais foram previamente submetidos ao exame andrológico e considerados aptos à reprodução. Coletas de sêmen foram realizadas durante o período de um mês, totalizando em 15 partidas congeladas. Após a coleta dos ejaculados por meio de vagina artificial, o sêmen foi imediatamente filtrado utilizando-se filtro de nylon, diluído na proporção 1:1 com meio comercial de refrigeração Botu-sêmen e avaliado quanto a motilidade, vigor, volume, coloração e aspecto. A concentração espermática foi determinada por meio de câmara de Neubauer. Preparação úmida seguida de quantificação de patologias utilizando método de Blom (1973) foi efetuada. Para a congelação, o meio comercial Botu Crio©, sem crioprotetor foi utilizado, sendo este o meio base utilizado para os tratamentos. Cinco ejaculados foram obtidos de cada animal e divididos em sete tratamentos distintos: DF à 4% (T1), ET à 4% (T2), ET à 2% + DF à 2% (T3), GL à 4% (T4), GL 2% + DF 2% (T5), ET 2% + GL 2% (T6) e diluente comercial BotuCRIO © (Grupo controle- T7).

Após realizado o protocolo de congelação como o proposto por Sampaio (2012), as palhetas passaram por descongelação (37°C por 30 segundos) e foram imediatamente submetidas a análise de motilidade e vigor. Para análise dos dados foi utilizado o programa estatístico Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas 9.1 (SAEG-UFV, 2007). Para todas as características estudadas foram estimadas as médias e desvios-padrão. Todos os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias, posteriormente

submetidas a ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5 % de probabilidade de erro. Quando não atendidas as premissas da ANOVA, os dados foram avaliados por análise não paramétrica (teste de Kruskal Wallis), também com 5 % de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão - Na tabela 1 estão sumariados os valores médios observados para as características físicas do ejaculado imediatamente após a diluição do pellet com os meios detratamento. A avaliação é demonstrada nos momentos pré congelamento e pós descongelamento. Observa-se que apenas o meio contendo etilenoglicol (T2) e aquele em que sua associação com o crioprotetor glicerol está presente (T6), não apresentam valores médios mínimos de motilidade espermática total e vigor para serem aprovados em programas de Inseminação Artificial, de acordo com os padrões recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal[7]. A queda na motilidade espermática após o descongelamento é associadaà perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides.Com isso, considera-se que variações observadas nas médias se devam às características associadas ao crioprotetor adicionado. Os demais tratamentos independentemente dos crioprotetores, apresentaram valores médios acima dos mínimos preconizados, estando todas as amostras aprovadas para uso em programas de inseminação.

Somente nos valores médios de motilidade espermática total do sêmen descongelado foi observada diferença ($p<0,05$). Vale ressaltar que os tratamentos adicionados de DF (T1, T3 e T5) apresentaram em valores absolutos, médias acima dos demais tratamentos à base de GL (T4), ET (T2) ou suas associações (T6), tendo T3 obtido as melhores médias observadas. Tal fato corrobora com a características bioquímicas da DF, pertencente ao grupo das amidas. Essas, formadas por grupos carbonila e amino, podem se ligar a três moléculas de água pela ligação com o hidrogênio, o que confere menor solubilidade e viscosidade. Associado a isso, seumenor peso molecular faz com que tenham maior permeabilidade na membrana, reduzindo assim as injúrias celulares causadas por danos osmóticos[2].

Tabela 1. Valores médios e erros padrão da motilidade espermática total e vigor espermático do sêmen de jumentos da raça Pêga criopreservado com diferentes diluidores intracelulares

TRATAMENTO	Motilidade(%)	Vigor	Motilidade(%)	Vigor
1	90,4 ± 1,5	4,0 ± 0,11	49,6 ± 4,2^{ab}	3,0 ± 0
2	90,7 ± 1,5	4,1 ± 0,11	26,5 ± 3,0^{c}	2,9 ± 0,05
3	90,0 ± 1,5	4,2 ± 0,10	57,8 ± 3,7^{a}	3,1 ± 0,06
4	89,6 ± 1,5	4,1 ± 0,13	39,2 ± 5,6^{bc}	3,0 ± 0,11
5	90,7 ± 1,6	4,1 ± 0,12	49,2 ± 6,5^{ab}	3,1 ± 0,12
6	91,1 ± 1,2	4,2 ± 0,09	33,8 ± 3,4^{bc}	2,9 ± 0,12
Controle	90,0 ± 1,7	4,1 ± 0,12	35,0 ± 2,9^{bc}	3,0 ± 0

Média ± SE; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença entre si ($p<0,05$) pelo teste de Tukey--Kramer

1-Dimetilformamida à 4%; 2-Etilenoglicol à 4%; 3-Etileglicol à 2% associado a dimetilformamida à 2%; 4- Glicerol à 4%; 5- Glicerol à 2% associado a dimetilformamida à 2%; 6-Etilenoglicol à 2% associado a glicerol à 2%; 7-diluente comercialBotuCRIO ©

Considerações Finais- Conclui-se que a associação dos crioprotetores etilenoglicol (2 %) e dimetilformamida (2%), mostra-se mais promissora como constituinte de meios de congelamentopara criopreservação do sêmen de asininos. Contudo, apesar dos resultados satisfatórios, testesde fertilidade do sêmen congelado *in vivo* ou programas de Inseminação Artificial ainda são necessários, visando sua validação.

Referências bibliográficas

[1] Adams, G. P.; Ratto, M. H.; Collins, C. W.; Bergfelt, D. R. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*. v. 71, p. 166-175. 2009.

[2] Ball, B. A.; Vo, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J of Androl*. v. 22, p.1061-1069, 2001.

[3] Barbas, J. P.; Mascarenhas, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. v. 10, p. 49-62. 2009.

[4] Blom, E. Pathological conditions in the genital organs and in semen as ground for rejection of bredding bulls for import or export to and from Denmark. *Nordisk Veterinaer Medicin*. v. 35, p. 105-130, 1973.

[5] Canisso, I.F.; Carvalho, G.R.; Davis Morel, M.; Ker, P.G.; Rodrigues, A.L.; Silva, E.C.; Coutinho da Silva, M.A. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equi Vet J*. v. 43, p. 179-183. 2011

[6] Canisso, I.F.; Souza, F.A.; Ortigoza, J.M.; Carvalho, G.R.; Daviesmorel, M.C.G.; Silva, E.C.; Guimaraes, J.D.; Lima, A.L. Freezing donkey sêmen (Equus asinus*). Revista de Investigaciones Veteerinarias del Peru*. v. 19, p.113-125. 2008.

[7] Colégio brasileiro de reprodução animal (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3. ed. Belo Horizonte. 2013.

[9] Harrison, R. A. P.; Vickers, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Anim Reprod*, v. 88, p. 343-352. 1990.

[12] Trimeche, A.; Renard, P.; Tainturier, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*. v. 50, p. 893 – 806. 1998.

[13] Vendramini, O.M.; Bruyas, J.F.; Fieni, F.; Battut, I.; Tainturier, D. Embryo transfer in Poitou donkeys, preliminary results. *Theriogenology*. v. 47, p.409. 1997.

[14] Vidament, M.; Vincent, P.; Martin, F. X.; Magistrini, M.; Blesbois, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci*. v. 112, p. 22 – 35. 2009.

[15] Wildt, D.; Pukazhenthi, B.; Brown, J.; Monfort, S.; Howard, J.; Roth, T. *Reprod. Fertil. Dev*. v. 7, p. 811-824. 1995.

[16] Sampaio, B. F. B. Adição de lipídeos ao diluente de congelação de sêmen de garanhões. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

Agradecimentos: CNPq, CAPES.

A influência do tempo na avaliação da integridade de membrana plasmática em sêmen bovino por meio da coloração eosina-nigrosina

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo[1]
myrian.hidalgo@uel.br
Ana Beatriz Marques de Almeida[1]
Josiana de Fátima Schnitzer[1]
Maria Isabel Mello Martins[1]
imartins@uel.br

Abstract: The aim of this study was to evaluate the integrity of the plasma membrane of bull's sperm at different times. It was used 10 doses of frozen semen; five different straws from each *Bos indicus* bull (N=2). For analysis, 3 µL of the post-thawed semen were deposited on a glass slide, then 3 µL of the supravital eosin-nigrosine dye were added to the smear, after 5 minutes the reading was performed. The results indicated that there was a difference between 5 min vs. 15 min interval (P=0.05). On the other hand, the results for: 5 min vs. 15 min interval (P=0.109) and 15 min vs. 30 min interval (P= 0.317) did not differ statistically. Thus, it is possible to infer that the smear must be read up to 15 min after drying without causing negative interference in theinterpretation of the results.

Keywords: andrology; dye; reproductive programs.

Palavras-chave: andrologia; corante; programas reprodutivos.

Introdução - Dentro dos programas reprodutivos, a utilização do sêmen bovino congelado representa a principal biotécnica reprodutiva quando se busca o melhoramento genético animal [1]. Entretanto, o processo de criopreservação pode causar danos aos espermatozoides, que refletem em decréscimo de aproximadamente 50% da motilidade espermática [2, 3] e quando considerada a integridade da membrana espermática esta queda pode ser mais acentuada, chegando a 60% [3]. A membrana plasmática tem importante papel em diversos eventos fisiológicos da função espermática, sendo responsável pela preservação da homeostase celular [4] participando dos processos de capacitação [5], da apoptose celular [6] e da fecundação, ao interagir com epitélio do trato reprodutivo feminino e com as células do complexo *cumulus oophorus* [7]. Desta forma, a análise deste parâmetro é considerada como reflexo da viabilidade celular, por estar envolvido diretamente com a capacidade fecundante do espermatozoide [5, 8]. A avaliação da integridade de membrana plasmática pode ser realizada com o uso de: sondas fluorescentes impermeáveis a membrana íntegra [9], teste hiposmótico [10] e a dupla coloração com eosina/nigrosina. A eosina é um coran-

[1] Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida- LARAA- UEL

te supravital que não penetra em células com membrana plasmática intacta, mas, quando lesadas, liga- se aos ácidos nucléicos, no qual lhe confere uma coloração rosa. A nigrosina é responsável pelo contraste mais escuro de fundo da lâmina, o qual permite a visualização dos espermatozoides não corados. Sendo assim, este teste tem sido recomendado como uma avaliação adicional àquelas de rotina [11]. Entretanto, sabe- se que não existe uma padronização do tempo de análise da coloração de eosina-nigrosina para avaliação da integridade de membrana plasmática em bovinos, sendo prejudicial, principalmente para a comparação dos resultados de diversas pesquisas. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a integridade de membrana plasmática de espermatozoides bovinos em três momentos após a confecção da lâmina, com intuito de se estabelecer um padrão de análise que possa incrementar a aplicação na prática e obter resultados fidedignos ao comparar procedimentos realizados em diferentes situações.

Material e Métodos - Todas as análises seminais foram processadas no Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida (LARAA- UEL). Foram utilizadas no total 10 doses de sêmen congelado; cinco partidas diferentes (0,25 mL) de cada touro da raça *Bos indicus* (N=2) e descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após a descongelação, todas as amostras foram depositadas em microtubos plásticos de 1,5 mL, previamente aquecidos à 37° em placa aquecedora e, imediatamente após, submetidas à avaliação espermática.

Para análise, uma alíquota de 3µL do sêmen pós- descongelação foi depositada sobre lâmina de vidro (Precision Glass Line®) de 26 x 76 mm, em seguida, foi adicionado 3µL de corante supravital eosina/nigrosina (BotuVital- Botupharma®, Botucatu, SP, Brasil) e realizado o esfregaço. De cada amostra foram realizadas três lâminas, as leituras foram após 5, 15 e 30 minutos. Para cada amostra de sêmen, foi realizada a contagem de 200 células, em aumento de 1000x, sob microscopia óptica (Olympus®, CX31, Tokyo, Japão). Quanto à interpretação, foi seguido orientação do fabricante, no qual espermatozoides corados em rosa, apresentavam membrana plasmática lesada e espermatozoides com ausência de coloração apresentavam membrana plasmática íntegra. Todas as análises foram realizadas pelo mesmo técnico e expressos em porcentagem.

Para a comparação dos resultados da avaliação da integridade de membrana plasmática em diferentes tempos foi realizado ANOVA de medidas repetidas, e após observado diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos foi realizado o teste de Tukey. O programa utilizado para os testes foi o Sigma Plot 12.0, considerando significativo quando $p<0,05$.

Resultados e Discussão – O percentual de células espermáticas viáveis registradas no teste supravital pelo corante eosina-nigrosina, demonstrou que houve diferença para o intervalo entre 5min vs. intervalo de 30min ($p= 0,005$). Por outro lado, os resultados encontrados para os intervalos: 5 min vs. 15min ($p= 0,109$) e 15min vs. 30min ($p= 0,317$) não diferiram, conforme sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultado da avaliação da integridade de membrana plasmática de espermatozoides de bovino,avaliados em diferentes tempos (média ± desvio padrão).

INTERVALO	Células íntegras (%)
5 minutos	71,2 ± 6,62[a]
15 minutos	62,9 ± 8,94[ab]
30 minutos	65,9 ± 7,69[b]

*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p< 0,05)

O processo de congelação/ descongelação do sêmen pode ocasionar crioinjúrias aos espermatozoides, muitas vezes irreversíveis, como a perda de motilidade e alterações estruturais e funcionais da membrana espermática, que levam à diminuição da fertilidade. Neste contexto, a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide é fundamental para que ocorra a capacitação espermática, reação acrossomal, fusão do espermatozoide com oócito [12] e para a manutenção e sobrevivência da célula espermática no genital feminino [13]. Sendo assim, a análise deste parâmetro e a padronização do mesmo seria crucial para sua utilização como método preditivo na seleção de reprodutores. Neste estudo, o percentual de espermatozoides com membrana íntegra demonstrou diferença entre os intervalos 5min vs. 30 min (p=0,05), sugerindo que a leitura da lâmina pode ser realizada até 15 min após a secagem do esfregaço sem causar interferência negativa na interpretação dos resultados.

Além disso, se considerarmos em termos práticos, para as avaliações andrológicas de rotina à campo, a técnica de eosina-nigrosina apresenta algumas vantagens, como o fato de ser executada com equipamentos portáteis e menos sofisticados e além de ser rápida e de baixo custo.

Considerações Finais – A avaliação da integridade de membrana plasmática pela eosina-nigrosina pode ser facilmente adicionada aos métodos de rotina, sendo que a padronização do tempo de avaliação em até 15 minutos após a realização do esfregaço da coloração eosina-nigrosina mostraram-se eficientes para a avaliação da integridade da membrana plasmática em bovinos.

Referências bibliográficas

[1] Freitas-Dell'aqua, C. P.; Crespilho, A. M.; Papa, F. O.; Dell' Aqua Junior, J. A. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. *Rev Bras Reprod Anim* 2009; 33: 213-222.

[2] Thomas, C. A.; Garner, D. L.; Dejarnette, J. M.; Marshall, C. E. Fluorometric Assessments of Acrosomal Integrity and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. *Biol Reprod* 1997; 56: 991–998.

[3] Celeghini, E.; Arruda, R. P.; Andrade, A.; Nascimento, J.; Raphael, C. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 479-488.

[4] Andrade, A.; De Arruda, R.; Celeghini, E.; Nascimento, J.; Martins, S.; Raphael, C.; Moretti, A. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim* 2007; 42: 190-194.

[5] Hallap, T.; Nagy, S.; Jaakma, U.; Johannisson, A.; Rodriguez-Martinez, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. *Theriogenology* 2006; 65: 1122-1136.

[6] Duru, N. K.; Morshedi, M.; Schuffner, A.; Oehninger, S. Cryopreservation- thawing of fractionated human spermatozoa and plasma membrane translocation of phosphatidylserine. *Fertil Steril* 2001; 75: 263-268.

[7] Hossain, M. S.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Nagy, S.; Siqueira, A. P.; Rodriguez-Martinez, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian J Androl* 2011; 13: 406.

[8] Naresh, S.; Atreja, S. Detection, Localization and Tyrosine Phosphorylation Status of Ser/Thr Protein Phosphatase1γ in Freshly Ejaculated, *In Vitro* Capacitated and Cryopreserved Buffalo Spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2015;50: 901-909.

[9] Peña, F. J.; Johannisson, A.; Wallgren, M. Assessment of fresh and frozen–thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 2003; 60: 677-689.

[10] Arruda, R.; Celeghini, E. D. C.; Alonso, M.; Carvalho, H.; Oliveira, L.; Nascimento, J.; Silva, D.; Affonso, F.; Lemes, K.; Jaimes, J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim* 2011; 35: 145-151.

[11] Brito, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 6, p. 249-264, 2007.

[12] Siqueira, J. B.; Guimarães, J. D.; Costa, E. P.; Henry, M.; Torres, C. A. A.; Silva, M. V. G. B.; Silveira, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *Revta Bras. Zootec* 2007; 36:387-395.

[13] Squires, E. L.; Pickett, B. W.; Graham, D. K.; Vanderwall, P. M.; Bruemmer, J. E. Cooled and frozen stallion semen. *Anim Reprod Biotechnol* 1999; Lab. 9:3-36.

Agradecimentos: À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

Efeito da adição de complexo colesterol-ciclodextrina associado à antocianina e diferentes crioprotetores sobre a qualidade seminal de garanhões

Victoria Kanadani Campos Poltronieri[1]
victoria.poltronieri@ufv.br
Bruna Waddington de Freitas[1]
Iara Magalhães Ribeiro[1]
Ytalo Galinari Henriques Schuartz[1]
José Domingos Guimarães[1]
jdguima@ufv.br

Abstract: Genetic improvement and increased productivity in equine breeding have considerably expanded the demand for the propagation of genetic material from established strains. Intending to favor logistics, the use of frozen semen was widespread in the market. However, in equine species, this process still requires improvements. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of freezing semen of stallions in a diluent containing glycerol and/or dimethylformamide (DG ∓ DMFA), associated with anthocyanin (ATC) and∓ or cholesterol-loadedcyclodextrin (CLC). Samples from both experiments were evaluated using flow cytometry for plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial potential and production of intracellularhydrogen peroxide. The DMFA and DG treatments showed better conditions to maintain sperm viability *in vitro*. Regarding the use of CLC, its association should preferably be made with DMFA.The action of ATC was not satisfactory, requiring further studies.

Keywords: *Equine, glycerol, semen.*

Palavras-chave: Equino, glicerol, sêmen.

Introdução - O estresse osmótico durante o congelamento e descongelamento de sêmen equinopode ser amenizado com o uso de crioprotetores capazes de penetrar a membrana plasmática rapidamente, sem gerar desidratação ou dano celular. O glicerol (GLIC) é frequentemente utilizado como crioprotetor, entretanto sua molécula produz danos às células devido sua permeabilidade reduzida, bem como por sua conhecida toxicidade[1]. Crioprotetores de menor peso molecular, como as amidas, em especial a dimetilformamida (DMFA) são associadas a melhores parâmetros de viabilidade *in vitro* pós-descongelamento[2].

Ciclodextrinas são moléculas capazes de carrear colesterol para dentro e fora da membrana plasmática. A incubação de espermatozóides com o complexo ciclo-dextrina-colesterol (CCC) antes da criopreservação proporciona ganhos na qualidade seminal[3]. Entretanto, foi

[1] Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa – MG, Brasil.

demonstrado que o CCC não foi eficiente em prevenir a peroxidação fosfolipídica da membrana de espermatozoides de camundongos[4]. Visando reduzir a ocorrência de tal evento, o uso da Antocianina (ATC), um composto fenólico antioxidante, mostra-se promissor. Dessa forma, objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito do congelamento de espermatozoides de garanhões em meio contendo glicerol e/ou dimetilformamida, associados ao carreador de CCC e a ATC, de forma combinada ou não.

Material e Métodos - Oito garanhões da Raça Mangalarga Marchador com idade entre 4-15 anos foram utilizados no estudo. As coletas foram realizadas no município de Viçosa, Minas Gerais (latitude 20º 45'20" Sul, longitude 42º 52'53" Oeste, altitude média de 752 m). De cada garanhão, no mínimo 5 ejaculados foram obtidos, totalizando 48 partidas congeladas para os testes de viabilidade espermática *in vitro*. Após a coleta dos ejaculados por meio de vagina artificial, o sêmen foi imediatamente filtrado, diluído na proporção 1:1 com meio comercial de resfriamento Botu-sêmen© e avaliado quanto a motilidade, vigor, volume, coloração e aspecto. A concentração espermática foi determinada por meio de contagem em câmara de Neubauer.

Após as avaliações imediatas, o sêmen já diluído, foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, e submetido a centrifugação a 600 g por 15 minutos[6]. Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração do *pellet* calculada em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração espermática, o *pellet* foi então homogeneizado com o diluente de congelamento do respectivo tratamento para uma concentração final de 50 milhões de espermatozoides por mL[7]. As amostras foram envazadas em 10 palhetas francesas de 0,5 mL por tratamento, conforme descrito posteriormente, devidamente identificadas, e então, refrigeradas a 5ºC por 20 minutos, de acordo com Sampaio (2012). Após este período as palhetas foram acondicionadas em vapor de nitrogênio, a 5 cm do nível da lâmina de nitrogênio líquido, por 15 minutos e posteriormente submersas em nitrogênio líquido, colocadas em raques e armazenadas em botijão criogênico.

Os grupos experimentais diferiram-se pela concentração dos crioprotetores adicionados ao meio de congelamento (dimetilformamida e glicerol), bem como pelos aditivos avaliados (ciclodextrina-colesterol e Antocionina). Ademais, associações de ambos os tratamentos também foram testadas, sendo os grupos divididos em:

- Grupo Glicerol (GLIC):

  - Tratamento 1 (GA): Botu-Crio® sem crioprotetor + GLIC (5 %) + ATC (0,25 %);
  - Tratamento 2 (GC): Botu-Crio® sem crioprotetor + GLIC (5 %) + CCC;
  - Tratamento 3 (GAC): Botu-Crio® sem crioprotetor + GLIC (5 %) + ATC (0,25 %) + CCC.

- Grupo Dimetilformamida (DMFA):

  - Tratamento 4 (DA): Botu-Crio® sem crioprotetor + DMFA (5 %) + ATC (0,25 %);

- Tratamento 5 (DC): Botu-Crio® sem crioprotetor + DMFA (5 %) + CCC;
- Tratamento 6 (DAC): Botu-Crio® sem crioprotetor + DMFA (5 %) + ATC (0,25 %) + CCC.

- Grupo Dimetiformamida-Glicerol (DG):

- Tratamento 7 (DGA): Botu-Crio® sem crioprotetor + DMFA (3 %) + GLIC (2 %) + ATC (0,25 %);
- Tratamento 8 (DGC): Botu-Crio® sem crioprotetor + DMFA (3 %) + GLIC (2 %) + CCC
- Tratamento 9 (DGAC): Botu-Crio® sem crioprotetor + DMFA (3 %) + GLIC (2 %) + ATC (0,25 %) + CCC.

- Grupo Testemunha (BC)

- Tratamento 10: Botu-Crio® comercial (glicerol a 1% associado à metilformamida a 4 %.)

O descongelamento do sêmen foi realizado mediante imersão das palhetas em banho maria a 37ºC por 30 segundos. Teste de termorresistência foi realizado por meio de avaliações subjetivas da motilidade espermática total e do vigor espermático, em microscópio óptico, nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após o descongelamento. Além dessa, foram realizadas avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, peroxidação da membrana espermática e produção de peróxido de hidrogênio intracelular por meio de citometria de fluxo. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial com tratamento adicional, sendo três crioprotetores, três diluentes e o Botu-crio© como grupo testemunha (3 x 3 + 1). As variáveis quantitativas foram avaliadas por análise de variância, contrastes com único grau de liberdade foram usados para comparar os tratamentos, grupos de tratamentos (efeitos principais) bem como as interações de interesse, usando o GLM *procedure*[11]. O vigor espermático (variável qualitativa) foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis usando o NPAR1WAY *procedure*[11]. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$. As correlações de características de interesse foram analisadas por correlações simples de Pearson por meio do PROCCOR.

Resultados e Discussão- Não houveram interações entre crioprotetores e diluentes para maioria das características estudadas, sendo as comparações realizadas entre grupos de tratamentos. Como descrito na tabela 1, entre os crioprotetores, o grupo DMFA apresentou os melhores resultados quanto à motilidade espermática, seguido do grupo DG ($p<0,05$). Dentre os aditivos, os grupos com associações CCC e AC foram superiores aos demais ($p<0,05$). Em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, os grupos BC e GLIC apresentaram os piores resultados dentre os crioprotetores, assim como os grupos BC e ATC dentre os aditivos ($p<0,05$). As maiores médias obtidas quanto ao potencial mitocondrial foram referentes aos grupos DMFA, DG, CCC e AC ($p<0,05$). Ademais, foi observada maior proporção de células viáveis com alta produção de peróxido de hidrogênio nos grupos DMFA e DG, CCC e AC ($p<0,05$). Em relação à peroxidação da membrana plasmática, interação

entre crioprotetores e aditivos pode ser constatada na população de células viáveis ($p<0,05$), de forma a revelar melhor associação da CCC à DMFA.

Tabela 1. Médias ± erros padrão da motilidade e vigor espermáticos de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador criopreservados em diluentes com diferentes aditivos avaliadas mediante teste de termo resistência em intervalos de 30 minutos após o descongelamento.

Variáveis	BC	GLIC	Crioprotetores			Aditivos	
			DMFA	DG	ATC	CCC	AC
MOT 0	29,9 ± 2,1^{C}	23,9 ± 1,1^{D}	44,5 ± 1,3^{A}	38,1 ± 1,4^{B}	33,3 ± 1,4^{BC}	35,5 ± 1,6^{AB}	37,7 ± 1,4^{A}
VIG 0	2,9 ± 0,1^{b}	2,7 ± 0,1^{c}	3,2 ± 0,1^{a}	3,0 ± 0,1^{b}	2,9 ± 0,1^{a}	2,9 ± 0,1^{a}	3,0 ± 0,1^{a}
MOT 30	15,2 ± 2,1^{C}	10,0 ± 1,1^{C}	30,0 ± 1,5^{A}	23,9 ± 1,6^{B}	17,6 ± 1,5^{B}	21,7 ± 1,7^{A}	24,6 ± 1,5^{A}
VIG 30	1,6 ± 0,2^{b}	1,1 ± 0,1^{c}	2,4 ± 0,1^{a}	2,1 ± 0,1^{a}	1,6 ± 0,1^{b}	1,8 ± 0,1^{ab}	2,1 ± 0,1^{a}
MOT 60	5,5 ± 1,6^{B}	4,7 ± 0,9^{B}	18,9 ± 1,5^{A}	16,1 ± 1,5^{A}	9,9 ± 1,2^{B}	14,4 ± 1,5^{A}	15,5 ± 1,4^{A}
VIG 60	0,7 ± 0,2^{b}	0,5 ± 0,1^{b}	1,7 ± 0,1^{a}	1,5 ± 0,1^{a}	1,0 ± 0,1^{bc}	1,3 ± 0,1^{ab}	1,5 ± 0,1^{a}
MOT 90	0,9 ± 0,6^{B}	0,7 ± 0,2^{B}	7,3 ± 0,9^{A}	6,8 ± 1,0^{A}	3,2 ± 0,6^{BC}	5,3 ± 0,9^{AB}	6,2 ± 0,9^{A}
VIG 90	0,1 ± 0,1^{b}	0,2 ± 0,1^{b}	1,0 ± 0,2^{a}	0,9 ± 0,1^{a}	0,4 ± 0,1^{b}	0,7 ± 0,1^{ab}	1,0 ± 0,2^{a}

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha nos grupos crioprotetores e aditivos diferem entresi pelo teste F ($p<0,05$).

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha nos grupos crioprotetores e aditivos diferem entresi pelo teste de Kurskal Wallis ($p<0,05$).

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %, ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carreado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carreado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio® (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

Crioprotetores menos permeáveis geram mais danos celulares frente aos desafios osmóticos durante o processo de congelamento[3], o que explica a menor porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras observada no tratamento à base de glicerol quando comparado ao tratamento à base de dimetilformamida. Todavia, a presença deste à 2 % em associação à dimetilformamida à 3 % parece ter influenciado positivamente, possivelmente em função de sinergismo entre os crioprotetores.

O possível aumento na estabilidade da membrana espermática decorrente do tratamento com CCC pode ter resultado na maior proporção de células viáveis não peroxidadas. Entretanto, a adição da CCC ao tratamento GLIC e DG resultou em aumento na peroxidação das células viáveis. É possível que a associação entre a CCC e os tratamentos em que o glicerol estava presente tenha resultado em maior dano osmótico às células em função do aumento na desidratação durante o resfriamento, suprimindo os efeitos benéficos da incorporação de colesterol na membrana plasmática.

Considerações Finais - A adição do complexo colesterol-ciclodextrina ao sêmen de garanhões Mangalarga Marchador no pré-congelamento mostrou-se positiva quanto a melhora da viabilidade espermática pós descongelamento *in vitro,* devendo ser realizada preferencial-

mente em meio crioprotetor contendo dimetilformalmida, ou essa associada a 2% de glicerol. Os resultados obtidos quanto à ação da ATC não foram satisfatórios, sendo necessários novos estudos quanto à concentração ideal e seus efeitos no congelamento de sêmen de garanhões.

Referências bibliográficas

[1] Ball, B. A.; Vo, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mithocondrial membrane potential. Journal of Andrology, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

[2] Gibb, Z.; Morris, L. H. A.; Maxwell, W. M. C.; Grupen, C. G. Dimethyl formamide improves the postthaw charactereistics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. Theriogenology, v. 79, p. 1027-1033, 2013.

[3] Hartwig, F. P.; Lisboa, F. P.; Monteiro, G. A.; Maziero, R. R.; Freitas-Dell'aqua, C. P.; Alvarenga, M. A.; Papa, F. O.; Dell´aqua Jr., J. A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative forbad cooler stallions. Theriogenology, v. 81, p. 340-346, 2014.

[4] Gray, J. E.; Starmer, J.; Lin, V. S.; DIckinson, B. C.; Magnuson, T. Mitochondrial Hydrogen Peroxide and Defective Cholesterol Efflux Prevent *In Vitro* Fertilization by Cryopreserved Inbred Mouse Sperm. Biology of Reproduction, v. 89, p. 1-12, 2013.

[5] Statistical analysis system - SAS. User's guide. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.

[6] Sampaio, B. F. B. Adição de lipídeos ao diluente de congelação de sêmen de garanhões. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

[7] Clulow, J. R.; Mansfield, L. J.; Morris, L. H. A.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Animal Reproduction Science, v.108, p.298-308, 2008.

Agradecimentos: FINEP, FAPEMIG, CAPES e CNPQ.

Protamine ratio in Nelore bulls of different *in vivo* fertility

Carlos Alonso Paco Nagaki[1]
Thais Rose dos Santos Hamilton[1]
Camilla Mota Mendes[1]
Mayra Elena Ortiz D Ávila Assumpção[1]
meoaa@usp.br

Abstract: As already known, impaired protamination is related to infertility in men and mice. The protamination occurs in late spermatogenesis and an ideal specie-specific ratio of protamine 1 and protamine 2 is required for adequate chromatin compaction. In bulls, protamination was only attributed to PRM1, until first PRM2 identification was reported. In this study, we aimed to compare Nelore bulls (*Bos indicus)* of different in vivo fertility (high-HF and low-LF). We used sperm from 14 bulls (7 HF and 7 LF groups) to evaluate sperm chromatin susceptibility assay, protamine deficiency and PRM1 and PRM2 gene expression. We did not observe differences between groups for all analyzed variables. However, we observed a pattern that indicated that low fertility bulls (LF) present a lower number of transcripts for PRM1 and PRM2, resulting in a lower PRM1/PRM2 ratio. Despite this behavior, we cannot attribute that fertility difference, in Nelore bulls, is due to protamination.

Keywords: chromatin, protamination, deoxyribonucleic-acid

Palavras-chave: cromatina; protaminação, ácido desoxirribonucleico.

Introduction: Sperm DNA assessment is useful for detecting alterations in chromatin composition, which are deleterious for reproductive success[1]. Although failures in sperm DNA integrity are not attributed to low fertilization rates, the chromatin susceptibility to fragmentation can compromise the embryonic development[2,3]. One of the main causes of increased chromatin susceptibility is impaired DNA compaction during sperm differentiation[4].

Immature sperm DNA is compacted by histones (HTs), which are replaced by protamines (PRMs) in late spermatogenesis. Protamination represents a mechanism to preserve chromatin integrity[1,5]. These protamines are divided into two families: protamine 1 (PRM1) and protamine 2 (PRM2), with PRM1 being predominant among mammals and PRM2 expression described only in few species[5,6].

The relation between PRM1:PRM2 varies among species, resulting in specie-specific ratios, which seems to be necessary for ideal compaction[1,5]. In humans and mice, aberrant ratios of PRM1:PRM2 are related to decreased sperm quality, damaged DNA, infertility

[1] Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo.

and poor embryonic development[7,8]. In bulls the compaction was traditionally attributed to PRM1, while bovine PRM2 was described by Maier *et al.*, (1990) only after *in vitro* translation. Recently, Hamilton *et al.* (2019) described PRM2 in bovine sperm. Authors established the transcript ratio between PRM1 and PRM2 by absolute qPCR in sperm and also in testicular tissue. Regardless of the low PRM2 expression and based in human and mice literature, we hypothesized that PRM1:PRM2 ratio may be altered in animals with high and low *in vivo* fertility.

In order to verify this, we compared PRM1:PRM2 ratios of transcripts obtained by real time quantification (rt-qPCR) from semen of commercial Nelore bulls of different fertility (high fertility -HF and low fertility-LF). Also, we performed a modified Sperm Chromatin Susceptibility Assay (SCSA) to evaluate double strand breaks after acid incubation; and protamine deficiency by CMA3 assay.

Materials and methods: The high and low fertility groups were characterized using a commercial score from the Reproduction Central CRV, called IFERT, which is based on data of over 170.000 fixed time AI. For this experiment, we considered samples from 7 bulls with IFERT *elite*, named as **high fertility (HF)** and 7 bulls with IFERT *inferior*, named as **low fertility (LF)** group; each bull was represented by a pool formed by 4 different semen straws**.** After thawing, semen straws were submitted to Percoll gradient (30%, 6600G/5min) and pellets were mixed forming the representative pool. Finally, semen pools were washed (1100G/3min) to measure sperm concentration and compose the aliquots for each analysis.

The susceptibility to acid denaturation of sperm chromatin (SCSA) was assessed as described by Evenson & Jost (2000) and adapted by Simões *et al.*(2013). The sperm protamine deficiency was assessed using the dye Chromomycin A3 (CMA3) according to (Simões *et al.*, 2009). The qPCR-RT was performed to quantify the number of absolute transcripts for PRM1 and PRM2 in each experimental group[10].

SAS System for Windows 9.3 was used to evaluate the variables. Data was analyzed to normality of the residues and homogeneity of the variances. T Test procedure was used to compare the experimental groups: high and low fertility.

Results and discussion: There were no differences between HF and LF groups for the percentage of sperm susceptible to DNA fragmentation after Acridine Orange (AO) staining (*table 1*). Our results agree with the finding of Simões *et al.* (2013) who observed that bovine spermatozoa showed also relatively less DNA fragmentation when compared with other species as humans, where fragmentation is very common among infertile men[8]. Also, we did not observe difference in protamine deficiency (CMA3) in both groups. These results disagree with the protamination differences observed by Castro *et al.* (2018) in bulls of different fertility *in vitro*.

After performing qPCR-RT, we did not observe differences between HF and LF groups; for PRM 1 and 2 gene expression. This absolute quantification was used to calculate protamine ratio in both experimental groups, results showed similar ratios between groups (table 1). As

known in other species, protamine ratios (PRM1/PRM2) are closely related to fertility, so we calculated also the relationship between protamines for each experimental group, obtaining no differences among groups. Despite not being possible to relate fertility difference among groups to protamine ratios, it is the first report of comparison between PRM1/PRM2 in bulls of different fertility in vivo.

Based in our results, bull PRM2 expression is reduced when compared to PRM1 in both groups, possibly attributing protamination to a single protamine (PRM1). It is believed that protamination in species with a single functional PRM are more resistant to *ex vivo* manipulation[14]. We suggest that chromatin structure in Nelore bulls (*Bos indicus)* is highly compacted and more resistant to injuries due to the high selection pressure in this specie over the years. However, this does not guarantee reproductive success as selected bulls still show fertility differences among them.

So far, there is very limited the information about protamination in bulls and fertility, so our results give an approach to the protamination status in Nelore bulls, so we expect new studies to be developed in order to explain the real protamine role in bull fertility.

Table 1 - Positive cells for acridine orange and CMA3 dye for each experimental group, expressed in arithmetical media and SEM. Also, the number of protamine transcripts after absolute quantification and the ratio PRM1/PRM2 observed for each experimental group.

Variable / Exp. Group	*P*	High Fertility (n=7)	Low fertility (n=7)
SCSA (%)	0.4334	0.62 ± 0.16	1.43 ± 0.95
CMA3 (%)	0.4981	0.25 ± 0.066	0.32 ± 0.08
PRM1 (#transcripts)	0.6157	1.19 ± 0.6	0.77 ± 0.54
PRM2 (#transcripts)	0.5937	0.09 ± 0.07	0.05 ± 0.02
Ratio PRM1:PRM2		1 / 0.08	1 / 0.07

Final considerations: It was not possible to find differences between the susceptibility to DNA fragmentation, protaminedeficiency or transcripts for PRM 1 and 2 between the groups tested. Therefore, we cannot attribute the difference in in vivo fertility between Nelore bulls to be due to failures in protamination.

Bibliography

[1] Akmal, M. *et al.* The important role of protamine in spermatogenesis and quality of sperm: A mini review. *Asian Pacific J. Reprod.* **5**, 357–360 (2016).

[2] Fatehi, A. N. *et al.* DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages. *J. Androl.* **27**, 176–188 (2006).

[3] Wdowiak, A., Bakalczuk, S. & Bakalczuk, G. The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection. *Reprod. Biol.* **15**, 94–100 (2015).

[4] Sakkas, D. & Alvarez, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril.* **93**, 1027–1036 (2010).

[5] Bao, J. & Bedford, M. T. Epigenetic regulation of the histone-to-protamine transition during spermiogenesis. *Reproduction* **151**, R55–R70 (2016).

[6] Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S. & Renkawitz-Pohl, R. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1839**, 155–168 (2014).

[7] Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum. Reprod. Update* **12**, 417–435 (2006).

[8] Aoki, V. W., Emery, B. R., Liu, L. & Carrell, D. T. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J. Androl.* **27**, 890–898 (2006).

[9] Maier, W., Nussbaum, G. & Domenjoud, L. The lack of protamine 2 (P2) in boar and bull. *Nucleic Acids Res.* **18**, 1249–1254 (1990).

[10] Hamilton, T. R. S. *et al.* Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology* 1–9 (2019) doi:10.1111/andr.12610.

[11] Evenson, D. & Jost, L. Sperm Chromatin Structure Assay for Fertility Assessment. *Curr. Protoc. Cytom.* **13**, 1–27 (2000).

[12] Simões, R. *et al.* Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo *in vitro* development outcome. *Reproduction* **146**, 433–441 (2013).

[13] Simões, R. *et al.* Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. *Biotech. Histochem.* **84**, 79–83 (2009).

[14] Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gouraud, A. & Holt, W. V. Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Mol. Reprod. Dev.* **78**, 951–961 (2011).

Acknowledgment: We would like to thank CAPES, which provided the financial support for this study.

Fertilidade do sêmen equino congelado com adição de pentoxifilina

Felipe Casellatto Antonioli[1]
Carla Patrícia Teodoro de Carvalho[1]
patriciacarvalho2008@gmail.com
Eneiva Carla Carvalho Celeghini[2]
Leonardo Batissaco[2]
Rafael Cuel Bortoletto[1]
Rubens Paes de Arruda[1]
Orientador: arrudarp@usp.br

Abstract: *Pentoxifylline has been studied as an enhancer of sperm motility, acting as a phosphodiesterase inhibitor, increasing levels of intracellular cAMP (Adenosine Cyclic Monophosphate). However, it is not clear whether improved sperm motility translates into better fertility rates after artificial insemination. For the experiment with frozen semen, two stallions and two treatments were used (control and with addition of pentoxifylline). Assessment of progressive motility in vitro was performed with the use of the CASA (Computer Assisted Sperm Analizys). For both stallions, 11 artificial inseminations were used for control group and 13 for treatment group, totalizing 48. The pregnancy diagnosis was made by ultrasound 14 days after ovulation. Our results showed a numerical difference between the group with the addition of pentoxifylline after thawing the semen (53.8%) and control (36.3%), therefore, we suggest that further studies be carried out with a greater number of artificial inseminations with the addition of pentoxifylline after thawing the semen.*

Keywords: *Stallion, Artificial Insemination, Motility*

Palavras-chave: Garanhão, Inseminação Artificial, Motilidade

Introdução: Diferente de outras espécies domésticas, a seleção genética dos equinos tem sido realizada com base apenas no desempenho atlético, conformação e características fenotípicas, não havendo uma preocupação com a inserção de atributos da saúde reprodutiva em cruzamentos comerciais. Dessa forma, a incidência de animais com baixa fertilidade, doenças genéticas ou predisposição a enfermidades reprodutivas adquiridas é elevada nesta espécie. A reprodução equina tem então, buscado cada vez mais maximizar a utilização do sêmen por meio da inseminação artificial utilizando-se o sêmen diluído a fresco, refrigerado e congelado. No entanto, ainda existem muitos desafios no uso dessas três modalidades, que englobam a manipulação, conservação e deposição do sêmen no trato reprodutivo da fêmea.

[1] Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP),Pirassununga, SP, Brasil.

[2] Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

A pentoxifilina tem sido estudada como potencializador da motilidade espermática, agindo como um inibidor da fosfodiesterase, aumentando os níveis de cAMP (Monofosfato Cíclico de Adenosina) intracelular, molécula envolvida na geração de energia pelo espermatozoide (Marques *et al.*, 2002). No entanto, não está claro se a melhora da motilidade espermática se traduz em melhores índices de fertilidade após inseminação artificial. Portanto, os objetivos deste estudo foram: observar *in vitro* a resposta da interação entre espermatozoide e pentoxifilina após incubação. Ainda, avaliar a fertilidade do sêmen congelado com adição de pentoxifilina.

Material e Métodos - Para o experimento foram utilizadas palhetas de dois garanhões da raça *Brasileiro de hipismo* com idades de 11 e 13 anos. Antes de cada colheita para congelação de sêmen, o pênis do garanhão foi higienizado e as colheitas foram realizadas com vagina artificial. Após a colheita, cada ejaculado foi filtrado para retirar a fração gel. As características seminais foram avaliadas imediatamente quanto ao aspecto, volume (mL), motilidade (%) e vigor (1-5) subjetivos. Posteriormente o sêmen foi diluído 1:1 em diluidor a base de leite desnatado BotuSêmen® (Botupharma, Brasil) e em seguida distribuído em tubos de 15 mL para centrifugação a 500 x g durante 12 minutos (centrífuga FANEM®, Brasil). Após a centrifugação o sobrenadante foi removido, o *pellet* de espermatozoides suspendido em diluidor de congelação BotuCrio® (Botupharma, Brasil) e a concentração ajustada em 200x106 espermatozoides por mL utilizando câmara de Neubauer. O sêmen foi envasado em palhetas de 0.5 mL (IMV® USA), e criopreservado utilizando máquina de congelação (TK 3000®, Brasil), sendo armazenado em botijões criogênicos para uso no momento da inseminação. Para realização das inseminações, foram utilizadas quatro palhetas descongeladas a 37ºC durante 30 segundos. Após a descongelação, no (Tempo 0) foi realizado a primeira avaliação da motilidade progressiva (grupo controle e com adição de pentoxifilina) pelo sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analisys*) utilizando o aparelho *Hamilton Thorne Research Motility Analyser* (HTM-IVOS, Versão 12.3, USA), no grupo tratado, foi adicionado ao sêmen pentoxifilina na concentração 7.18 mM (1.9 mg/mL), como descrito por Tusonoda e colaboradores (2015). Após dez minutos de incubação (Tempo 1) para uma perfeita interação entre os espermatozoides e pentoxifilina, foi realizado uma nova análise da motilidade espermática (grupo controle e com adição de pentoxifilina). Foram utililizadas 11 inseminações no grupo controle e 13 no grupo tratamento para ambos os garanhões. As fêmeas que apresentaram sinais de estro foram submetidas a um programa de acompanhamento reprodutivo que consistiu na palpação e ultrassonografia transretal do útero e ovários, diariamente. Quando um folículo ovariano atingiu 35 mm de diâmetro, presença de edema uterino 3 (Escala de 1-4), a fêmea recebeu 250ug em dose única de histrelina acetato (Strelin®, Botupharma, Brasil), via intramuscular, para a indução da ovulação. Após 24 horas as éguas passaram por palpação e ultrassonografia transretal, a cada 6 horas, quando então a inseminação artificial no corno ipsilateral à ovulação contendo 100x106 de espermatozoides com motilidade foi procedida. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal aos 14 dias após a ovulação. Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS®, versão 9.3 (SAS, 2005).

Resultados e Discussão - Embora Marques *et al.* (2002) tenham encontrado aumento da motilidade progressiva com adição da pentoxifilina no sêmen pós-descongelação, em nossas análises não houveram diferenças estatísticas significativas da motilidade progressiva (Tabela 1) entre os grupos controle e tratamento, bem como nos tempos 0 e 1, após a adição de pentoxifilina, corroborando com Tsonoda *et al.* (2015).

Tabela 1. Médias (± erros padrão) da motilidade progressiva (CASA) de espermatozoidesequinos após incubação com pentoxifilina.

Garanhão	Motilidade Progressiva (%)			
	Controle*		Tratamento**	
	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 0	Tempo 1
A	66.17 ± 3.31	66.67 ± 3.72	66.17 ± 3.92	65.83 ± 1.94
B	64.00 ± 4.82	63.33 ± 2.07	63.67 ± 3.56	63.20 ± 3.90
Média	65.08 ± 4.10	65.00 ± 3.36	64.92 ± 3.80	64.64 ± 3.14

*Controle = sêmen sem adição de pentoxifilina; **Tratamento = sêmen com adição de pentoxifilina; Tempo 0 = sêmen avaliado após a descongelação; Tempo 1 = avaliação após 10 minutos do tratamento (P>0,05).

Para avaliação da fertilidade (Figura 1) o Garanhão A teve como resultado taxa de prenhez 36.3% (4/11) no grupo controle, e 53.8% (7/13) no grupo tratamento. Para o Garanhão B, a taxa de prenhez encontrada foi de 36.3% (4/11) para o grupo controle, e 30.7% (4/13) para o grupo tratamento. Os resultados encontrados apresentaram diferiram numericamente entre os grupos, embora não tenha apresentado diferença estatística P>0,05.

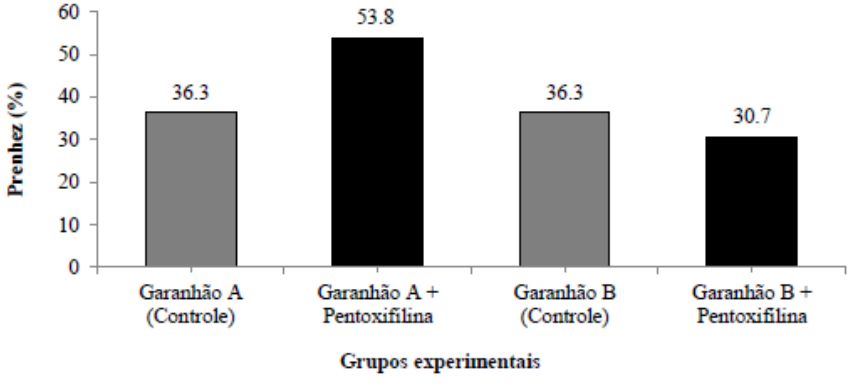


Figura 1. Taxa de prenhez do sêmen congelado de equinos utilizando pentoxifilina (P>0,05).

Considerações Finais - A pentoxifilina não apresentou aumento da motilidade espermática e fertilidade do sêmen equino congelado na concentração utilizada, embora nossos resultados

indiquem uma diferença numérica importante na fertilidade entre o grupo com adição de pentoxifilina e controle, respectivamente (53.8% e 36.3%). Provavelmente, não houve diferença estatística entre os grupos pelo pequeno número de inseminações realizadas. Sugerimos a realização de novos trabalhos com adição da pentoxifilina após a descongelação do sêmen com número maior de inseminações.

Referências bibliográficas

[1] Marques A; Arruda RP; Celeghini ECC; Gobesso AAO; Neves NJR. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to *in vitro* incubation. Theriogenology, v. 58, p. 257-260, 2002. https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00872-5

[2] Tsunoda RH; Arruda RP, Serrano-Recalde EC, Oliveira BMM; Florez-Rodriguez SA; Alves, MBR., Celeghini ECC. Addition of pentoxifylline to skim milk–based extender on frozen-thawed equine sperm. Journal of equine veterinary science, v. 35, n. 10, p. 823-829, 2015. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.08.001

Agradecimentos: À FAPESP pela bolsa de Iniciação Científica.

Caseinato de sódio no aumento do tempo de equilíbrio para criopreservação de sêmen equino: uma opção à longas distâncias?

Wallyson Rafael Machado Santos[1]
Pedro Albuquerque de Lima[1]
Tuana da Cunha Reis[1]
Leonardo De Barros Pessoa[1]
Geraldo Francisco dos Santos Júnior[1]
Sâmara Cristine Costa Pinto[2]
Jair Perez Osório[3]
Luciane Maria Laskoski[4]
Fernando Andrade Souza[4]
fernando.andrade@ufpr.br

Abstract: This study aimed to evaluate the freezability of seminal samples of stallions American Quarter has frozen after 0, 12 and 24 hours of refrigeration at 5 °C, using three concentrations of sodium caseinate in the cryopreservation media (0, 1 and 2%). Randomized block design with plots subdivided into factorial 3x3. To evaluate the functionality of the plasma membrane, the HOST test was used, using the Term Resistance test (TTR) to assess the longevity of sperm cells. There was no significant difference (P>0,05) between groups for membrane integrity (HOST), whereas for TTR it was possible to observe a difference (p <0.05) for the group that used 2% sodium caseinate for 24 hours. Thus, it was concluded that the use of caseinate in transport for 24 hours can decrease seminal longevity, and the use of this concentration in this period is not indicated.

Keywords: Antioxidant, HOST, TTR.

Palavras-chave: Antioxidante, HOST, TTR.

Introdução: Ao passar pelo processo de congelação, os espermatozoides sofrem danos oxidativos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) provenientes do metabolismo espermático. Esses fatores, por sua vez, podem levar à redução subsequente da longevidade dos espermatozoides criopreservados. Assim, buscando prevenir as crioinjúrias sofridas pelas células espermáticas durante o processo de refrigeração e criopreservação, se adiciona ao sêmen diluidores e crioprotetores [1]. O leite desnatado e/ou a gema de ovo são os principais agentes protetores adicionados nestes meios, possuindo lipoproteínas que têm a capacidade de estabilizar elementos proteicos da membrana do espermatozoide [2].

[1] Universidade Federal do Acre.
[2] Universidade de São Paulo.
[3] Universidad deLa Salle.
[4] Universidade Federal do Paraná.

O leite age se ligando às proteínas do plasma seminal, podendo proteger a célula espermática de passar pelo processo de capacitação ou reação acrossômica antecipadamente. No leite existe cerca de 3,5% de proteínas, sendo as caseínas as de maior quantidade, representando 80% [3]. Diluidores a base de caseínas, aumentam a quantidade de espermatozoides que se ligam a zona pelúcia, cerca de quatro vezes mais. As caseínas são capazes de proteger as células espermáticas por diminuir a perda de lipídios, pois diminuem as ligações das proteínas do plasma seminal com a membrana plasmática [4].

Desta maneira, objetivou-se avaliar a condição, estrutural e funcional, do sêmen criopreservado com diluidor a base de gema de ovo e diferentes concentrações de caseinato de sódio após serem submetidos a refrigeração de 5 ºC por 0, 12 e 24 horas.

Material e Métodos: Utilizaram-se 10 ejaculados de 10 garanhões da raça quarto de milha, sob regime regular de colheita de sêmen, previamente selecionados por exame andrológico, de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [5], localizados na cidade de Rio Branco – Acre (Latitude: - 9.974, Longitude: -67.8076; 9° 58′ 26″ Sul, 67° 48′ 27″ Oeste).

Após a colheita os ejaculados foram filtrados para remoção da fração gel, sendo colocados em tubos falcon de 50 mL e diluídos em meio Kenney (1975) [6] modificado, acrescidos de 2% de caseinato de sódio a 37 °C. Previamente a diluição, cada ejaculado foi avaliado quanto aos aspectos físicos (motilidade subjetiva e vigor) e morfológicos [5].

O ejaculado após a diluição inicial (Kenney a 2% de caseinato de sódio) foi dividido em três grupos: T0 (criopreservação após colheita); T12 (Criopreservação 12 horas após refrigeração) e T24 (criopreservação após 24 horas de refrigeração). A diluição utilizada foi de 2:1 para todos, sendo 2 partes de diluente e uma do ejaculado. Para refrigeração utilizou-se caixas de transportes específicas para sêmen, Botuflex (Biotupharma, Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil), capaz de manter a amostra a 5 °C por até 48 horas.

Para a remoção do plasma seminal o ejaculado foi processado em centrífuga de ângulo variável (Celm LS-3 Plus) a 600g / 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o pellet formado foi ressuspendido com os diluidores para a criopreservação a serem testados. Assim tendo, tratamento 1: Controle (diluidor TRIS); Tratamento 2: Caseinato de sódio na concentração de 1% (diluidor TRIS); Tratamento 3: Caseinato de sódio na concentração de 2% (diluidor TRIS). Com isto, realizaram-se 9 tratamentos (fatorial 3 x 3; concentrações de caseinato de sódio x tempos de refrigeração). Após as diluições de acordo com cada grupo, os quais passaram por cada período objetivado, o sêmen foi envasado manualmente em palhetas de 0,5 mL em uma concentração de $50x10^6$ sptz/palheta, sendo congeladas segundo Forero-Gonzalez *et al.* (2021).

Após o descongelação das palhetas, avaliaram-se motilidade subjetiva, vigor e defeitos espermáticos segundo o preconizado pelo CBRA [5]. Realizaram-se os testes HOST e TTR segundo Snoeck *et al.* (2014) [7] e Emerick *et al.* (2011) [8], respectivamente.

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso em fatorial 3x3, sendo as variáveis paramétricas testadas por ANOVA, usando teste de Tukey. Utilizou-se o teste de Friedman para as variáveis não paramétricas. Para todas as análises usou-se significância de 5%. Todas as variáveis passaram pelo teste de normalidade de Lilliofers.

Resultados e Discussão: As amostras refrigeradas em caseinato a 2% por 0, 12 e 24 horas apresentaram motilidade (%) e vigor (0-5) de 82,0 ± 3,7, 71,0 ± 3,3 e 52,0 ± 2,6, respectivamente. Os valores obtidos de motilidade em todos os tempos de refrigeração se encontraram dentro dos padrões desejáveis segundo o CBRA [5]. Houve diferença significativa ($p<0,05$) da motilidade entre os grupos T0 e T24, observando declínio de 30 pontos percentuais dentro do intervalo de 24 horas. Apesar de ser esperado queda na motilidade do sêmen sob refrigeração por 24 horas, acreditava-se que a adição de 2% de caseinato ao meio de transporte seminal poderia diminui-la, algo que não foi confirmado aqui.

Contudo, apesar de não se ter feito teste de fertilidade *in vivo* neste estudo, os resultados de motilidade final, com valor médio de 50%, atestaram, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, que este sêmen poderia ser utilizado sem prejuízo para a inseminação.

As avaliações do teste hiposmótico, representando a integridade da membrana plasmática, tiveram valores de 70,8 ±3,64, 60,0 ± 9,2 e 54,8 ± 14,84, para os tempos de 0, 12 e 24 horas de resfrigeração, respectivamente.

A queda da motilidade dentro do tempo é, parcialmente, explicada pelos resultados da integridade da membrana os quais acompanharam a relação da motilidade. Esperava-se que houvesse menor queda, com maior número de células íntegras no período de 24 horas, uma vez que o caseinato de sódio favorece menor contato das proteínas à membrana plasmática, diminuindo a capacitação espermática e a reação acrossômica, o que poderia ter favorecido melhor resposta.

Uma vez não apresentando diferença no resfriamento dentro dos tempos, fez-se a congelação com diferentes concentrações de caseinato dentro dos diferentes tempos de resfrigeração. Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos após o teste de HOST, indicando que as células espermáticas tiveram resposta semelhante, independe das concentrações de caseinato e o tempo de refrigeração antes da criopreservação, sendo os valores médios de 33,43 ± 7,45, 34,43 ± 6,33 e 31,6 ± 6,06 para os tempos 0, 12 e 24 horas, independe das concentrações utilizadas.

As respostas do TTR, pós descongelação, são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Médias ± DPM da motilidade subjetiva durante o teste de termo resistência do sêmen criopreservado 0, 12 e 24 horas após a coleta utilizando 0, 1 e 2% de caseinato de sódio.

	T0			T12			T24		
	[ ] 0%	[ ] 1%	[ ] 2%	[ ] 0%	[ ] 1%	[ ] 2%	[ ] 0%	[ ] 1%	[ ] 2%
0'	45±12	49±13^{a}	42±14,8	45±12^{ab}	42±8,4^{abd}	32±12,4	31±9	21±7,7^{b}	21±7,7^{bc}
10'	57±13,6^{a}	59±13,2^{a}	50±14	53±17^{ac}	50±10^{ac}	42±14,4	39±9,4	31±13	27±9,5^{b}
20'	63±13,6^{a}	58±10,4^{ab}	46±10	56±17^{abd}	51±11	41±17,2	42±11	33±14^{b}	30±13^{bc}
30'	59±11,2^{a}	49±9,4	40±16	50±16	47±12	33,5±17,2	38±13	31±15	27±13^{b}
40'	48±6,8^{a}	50±10^{ab}	31±11,4	37±12	40±10	27,5±10^{b}	34±11	24±12	20±8,7^{bc}
50'	43±11^{a}	41±9,2	26±10,4	33±14	37±13	25±10	30±11	24±14	18±12^{b}
60'	42±10^{a}	34±10	23±12,2	32±13	33±9,6	22±10,8	25±12	19±11	16±10^{b}
Δ	**3**	**15**	**19**	**13**	**9**	**10**	**6**	**2**	**5**

Letras distintas na mesma linha diferem pelo teste de Friedman ($p<0,05$). Δ: diferença entre as motilidades inicial e final. T0 = criopreservação imediata; T12 = criopreservação após 12 horas de refrigeração; T24 = criopreservação após 24 de refrigeração; [ ] 0% = sem adição de caseinato; [ ] 1 = 1% de caseinato; [ ] 2 = 2% de caseinato.

No TTR observou-se que houve diferença (p<0,05) para o grupo T24 [ ]2%, podendo existir dois fatores atrelados a isto. Uma, o tempo de refrigeração previamente a congelação, pois após 24 horas de refrigeração muitos metabólitos são acumulados no meio de refrigeração reduzindo significativamente a motilidade espermática das células. E dois, a concentração de caseinato de sódio, sendo observado que o tratamento com 2%, embora não tenha sido estatisticamente inferior nos demais grupos, foi numericamente inferior ao grupo controle e ao grupo [ ] 1%, nos tempos 0, 12 e 24 horas.

Conclusões: A integridade da membrana plasmática, frente ao tempo de refrigeração e a concentração de caseinato de sódio, não sofreu alteração, sendo a longevidade espermática prejudicada com o aumento dessa proteína. Assim, não se indica a concentração de 2% de caseinato de sódio em refrigerações acima de 12 horas que se destinam a criopreservação de sêmen.

Referências bibliográficas

[1] OLIVEIRA GCD, OLIVEIRA BMM, CELEGHINI ECC, FERNANDES CB, MATTOS CB.Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. RBRA. 2013;37:23-28.

[2] WATSON PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C byegg yolk lipoprotein. J Reprod Fertil. 1981;62:483-492.

[3] FOX PF, BRODKORB A. The casein micelle: historical aspects, current concepts andsignificance. Int Dairy J. 2008;18:677-684.

[4] BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. Biol Reprod. 2007;77:120-126.

[5] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3. ed. Belo Horizonte; 2013.

[6] KENNEY RM, BERMAN RV, COOPER WL, MORSE GW. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: Annual convention, american association equine practitioners, 1975. Boston, 1975;21:327-335.

[7] SNOECK PPN, MELO MIV, ALVES SGG, BITTENCOURT RF, RIBEIRO FILHO AL, CHALHOUB M, HENRY M. Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados? Rev. Bras. Med. Vet., 2014;36:355-361.

[8] EMERICK LL, Dias JC, Vale Filho VR, Silva MA, ANDRADE, VJ, LEITE, TG, Martins JAM. Avaliação da integridade de membrana em espermatozóide bovino criopreservado para prever oíndice de prenhez. Ciênc Anim Bras. 2011;12:536-546.

Zinc signature and CTC demonstrates that Percoll® does not induce premature spermcapacitation in nellore bulls

Julia de Lima Simões[1]
jdelimasimoes@gmail.com
Thais Rose dos Santos Hamilton[1]
Camilla Mota Mendes[1]
Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção[1]
meoaa@usp.br

Abstract: The success of *in vitro* production depends on meeting the gametes' demands. Regarding sperm, capacitation is essential for fertilization, promotion of functional and structural changes in membrane permeability and consequent calcium influx. However, despite the importance, a premature capacitation is known to impair fertilization. Manipulation, freeze/thawing, and sorting are known to cause an early capacitation, effect that is not yet clear for sperm selection by Percoll® gradient, an important step for IVF. Recently zinc measurement has been associated as a method to access sperm capacitation. To test whether Percoll® gradientinduces premature capacitation, semen of 10 Nellore bulls, were submitted or not to thistechnique. Sperm capacitation was evaluated by chlortetracycline (CTC) and zinc (FZ3) assay. Semen submitted to Percoll® gradient presented lower percentage of capacitated sperm and reacted spermatozoa by FZ3 and CTC evaluation, respectively, showing that Percoll® gradient does not induce sperm capacitation.

Keywords: *sperm capacitation, in vitro embryo production, CTC.*

Palavras-chave: capacitação espermática; *produção in vitro de embriões, CTC.*

Introdução - A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia de eleição para a obtenção de embriões bovinos e consiste em três etapas: maturação oocitária, fecundação e cultivo dos embriões *in vitro* [1]. Na fecundação, o espermatozoide deve estar apto para fecundar o oócito [2], e para tanto deve sofrer capacitação espermática. Neste processo complexo, o espermatozoide passa por mudanças funcionais e estruturais [3], que se inicia com o efluxo de colesterol da membrana plasmática (MP), resultando no aumento da permeabilidade e no influxo de íons de cálcio [4], além da participação de outras moléculas.

Fisiologicamente, após a ejaculação, os espermatozoides móveis acendem pelo trato reprodutivo da fêmea e durante esse trajeto há indução da capacitação. Na produção *in vitro de embriões*, para a seleção dos espermatozoides móveis a técnica mais utilizada é o gradiente de densidade de sílica coloidal (Percoll®) [5]. Esse processo consiste em centrifugar o sêmen,

[1] Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science,Universidade de São Paulo.

fazendo com que os espermatozoides móveis fiquem no sedimento. O ensaio da clortetraciclina (CTC) é a técnica de eleição para a avaliação da capacitação espermática. O ensaio consiste no aumento da fluorescência quando o CTC penetra a membrana celular e se liga ao cálcio livre, avaliando assim o influxo de cálcio [6].

Recentemente Kerns *et al.* (2018) descreveram o zinco como indicador de diferentes estágios da capacitação espermática. Segundo os autores, a localização (assinaturas) do zinco na célula espermática pode ser utilizada como biomarcador de qualidade e de fertilidade [7]. Os canais de zinco interferem na capacitação espermática, porém sua relação com outros processos moleculares no espermatozoide ainda não foi completamente elucidada [8]. O zinco está presente em altas concentrações no plasma seminal do macho e sua inibição no espermatozoide permite que ocorra a capacitação espermática e a fecundação [9]. Visto a importância deste íon no processo de inibição da capacitação espermática prematura e baseado na manipulação durante a separação dos espermatozoides por gradiente de Percoll®, com a remoção do plasma seminal e o processo de centrifugação, este estudo teve como objetivo avaliar a capacitação espermática em amostras seminais bovinas submetidos (PÓS) ou não (PRÉ) ao gradiente de Percoll®.

Material e Métodos – Foram avaliadas amostras de sêmen congeladas de 10 touros da raça Nelore utilizados pelo Laboratório de Biologia do Espermatozoide da USP, para a produção *in vitro* de embriões. As amostras seminais foram avaliadas no momento após a descongelação e após a submissão ao gradiente de Percoll®. Duas palhetas de cada touro foram descongeladas, o conteúdo misturado sendo metade do volume submetido à lavagem simples (1100 G/3min) com o intuito de somente retirar o diluidor, constituindo o grupo PRÉ. A outra metade da amostra foi submetida ao gradiente de Percoll® (45 e 90%, 6600 G/5min), constituindo o grupo PÓS. Foram utilizadas duas palhetas para conferir espermatozoides suficientes para as análises, sendo a concentração ajustada para 40 milhões de células/ml e incubadas com a sonda de Zinco e 25 milhões de células por ml para o CTC. O status de capacitação espermática foi avaliado pelo Ensaio de Clortetraciciclina avaliados em microscopia de fluorescência, classificados em três categorias: 1 - não capacitado (fluorescência amarela em toda a célula), 2 - capacitado (somente o acrossomo em amarelo) e 3 - reagido (sem fluorescência amarela na cabeça, indicando que a reação acrossomal) e pela assinatura de zinco utilizando a sonda Fluozin™ -3 AM (FZ3), avaliados em microscopia de fluorescência e classificados de acordo com a localização do zinco: Assinatura ZN 1 - não capacitado (fluorescência verde localizada em toda célula), Assinatura ZN 2 - em capacitação (fluorescência verde localizada na peça intermediária e cabeça), Assinatura ZN 3 – capacitado com fluorescência restrita à peça intermediária, e Assinatura ZN 4 - capacitado sem fluorescência. Para a análise estatística foi utilizado o programa SAS System (SAS Institute, Cary, NC, USA) e procedimento T Test para a comparação dos dois grupos experimentais (pré e pós Percoll). Foi considerado o nível de significância de 5% e os dados estão apresentados como média ± EPM (erro padrão da média).

Resultados e Discussão - Para a avaliação do ensaio da CTC, o grupo PÓS apresentou maior porcentagem de espermatozoides na categoria 1 (não capacitado) e menor porcentagem de espermatozoides na categoria 3 (reagido) quando comparado ao grupo PRÉ. Em relação à assinatura de zinco nas amostras espermáticas submetidas ou não ao gradiente de Percoll® houve diferença significativa nas assinaturas ZN3 e ZN4, sendo ambas menores no grupo PÓS (tabela 1).

Tabela 1. Média e erro padrão da média das variáveis avaliadas para capacitação espermática pelo ensaio da CTC, categorias de 1 a 3 e das assinaturas de Zinco 1 a 4, nos grupos PRÉ e PÓS, e respectivos valores de *p*.

Variáveis (%)	Grupo Pré	Grupo Pós	p
CTC categoria 1	4.70 ± 1.97[a]	20.64 ± 3.97[b]	0.0032
CTC categoria 2	12.31 ± 2.80	20.02 ± 3.05	0.0792
CTC categoria 3	82.99 ± 4.11[a]	59.34 ± 5.16[b]	0.0022
Assinatura ZN 1	6.207 ± 2.31	14.11 ± 4.21	0.1229
Assinatura ZN 2	33.39 ±4.32	45.32 ± 3.96	0.0569
Assinatura ZN 3	4.86 ± 1.02[a]	1.95 ± 0.61 [b]	0.0257
Assinatura ZN 4	55.55 ± 4.55[a]	38.62 ± 3.91[b]	0.0114

O gradiente de densidade Percoll® é essencial para a utilização de espermatozoides com maior qualidade na FIV [10] além de aumentar o padrão de motilidade [11] e a porcentagem de células íntegras e com o acrossoma intacto [12]. O processo de criopreservação causa alterações semelhantes à capacitação espermática prematura, denominado de criocapacitação [13]. A criopreservação induz alterações na região lipídica da membrana do espermatozoide, promovendo aumento da permeabilidade celular e consequentemente a entrada de cálcio da célula, podendo ou não induzir a capacitação espermática [14-15]. Mesmo não estando claro se a passagem dos espermatozoides pelo gradiente de Percoll® promove a capacitação completa, os resultados do presente estudo demonstraram, tanto pelo CTC quanto pelas assinaturas de ZN, que o Percoll® seleciona os espermatozoides não capacitados, evidenciado pelo menor número de células capacitadas no grupo PÓS. [17]. Mesmo com a utilização de agentes capacitores (heparina) no meio FIV [16] é necessário que os espermatozoides fiquem um período mais longo neste ambiente, mimetizando o tempo que fica em contato com as células do oviduto [17], já que nem todas as células respondem ao processo de capacitação sincronicamente [18]. Sendo assim a capacitação espermática antecipada resulta na reação acrossomal precoce, perda da viabilidade espermática no momento da fecundação dos oócitos [19,13] sendo assim prejudicial à PIVE, por criar um ambiente oxidante durante a etapa da fecundação *in vitro*.

Considerações Finais - Concluímos com esse trabalho que o gradiente de densidade Percoll® promove a seleção de células não capacitadas, sendo uma ferramenta importante na produção *in vitro* de embriões.

Referências bibliográficas

[1] Sartori R, Prata AB, Figueiredo ACS, Sanches BV, Pontes GC, Viana JHM, Pontes JH, Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Dode MAN, Monteiro PLJ, Baruselli PS. Update and overview on assisted reproductive Technologies (ARTs) in Brazil Animal Reproduction. Anim Reprod 2016; 13:3.

[2] Henkel RR, Schill W. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 2003;1:108.

[3] Georgadaki K, Khoury N, Spandidos DA, Zoumpourlis V. The molecular basis of fertilization (review). Intern Journ Of Mol Med 2016; 38:4.

[4] Abou-Haila A, Tulsiani DR. Signal transductions pathways that regulate sperm capacitation and the acrossome reaction. Arch Of Bioche and Biophy 2009; 1;485.

[5] Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrossome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. Reprod of Dom An 2002; 37.

[6] Ward CR, Storey BT. "Determination of the time course of capacitation in mouse spermatozoa using a chlortetracycline fluorescence assay". Develop Bio 1984;104:2

[7] Kerns K, Zigo M, Drobnis EZ, Sutovsky P. Zinc ion flux during mammalian sperm capacitation. Nat Comm 2018; 9:2061.

[8] Lishko PV, Botchkina IL, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by flagelar voltage-gated próton channel. Cell 2010; 140:327-37.

[9] Andrews JC, Noland JP, Hammerstedt RH, Bavister BD. Role of zinc in hamster sperm capacitation. Bio Rep 1994; 51:1238-47.

[10] Samardzija M, Karadjole M, Getz I, Makek Z, Cergolj M, Dobranic T. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development *in vitro*. Reprod Bio Endoc 2006ª;58:237- 47.

[11] Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production *in vitro*. Therio 2006;66:1185-93.

[12] Zuccari CESN, Carrijo PR, Leite PA, Scaldelal PRR, Rodovalho NCM, Zanenga CA, Kiefer C, Silva EVC. Seleção em gradiente de Percoll sonre os parâmetros espermáticos de sêmenbovino congelado. Rev Bras Saú Prod An 2008;9:2:358-66.

[13] Pérez-PÉ R, Grasa P, FERNÁNDEZ-Juan M, Peleato ML, Cebrián-Pérez JÁ, Muiño-Blanco T. Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. Mol Repro and develop 2002;61:2:226-33.

[14] Pons-Rejraji H, Bailey JL, Leclerc P. Cryopreservation affects bovine sperm intracellular parameters associated with capacitation and acrosome exocytosis. Reprod, Fert and Develop 2009;21:4:525-37.

[15] Breininger E, Cetica PD, Beconi M. Capacitation induces act through diverse intracelular mechanisms in cryopreserved bovine sperm. Therio 2010;74:6:1036-49.

[16] Assumpção MEOA, Haipeck H, Lima K, Mello MRBD, Oliveira LJD, Oliveira VPD, Tavares LMT, Visintin JÁ. Capacitação espermática *in vitro* com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. Braz J Vet Res Anim Sci 2002;39:3:149-156.

[17] Scheider C, Ellington J, Wright R. Relationship between bull fertility and *in vitro* embryo production using sperm preparation methods with and without somatic cell co-culture. Therio 1999; 51:6:1085-98.

[18] Rodriguez-Martinez H. Sperm Function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. Archiv Fur Tierzucht 2001; 44:102-113.

[19] Aitken TJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. Mol Reprod and Develop 2017.

[20] Siqueira AFP, De Castro LS, De Assis PM, De Cássia Bicudo L, Mendes CM, Nichi M, Assumpção MEOA. Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. PLoS One 2018, v. 13, n. 7, p. 1–16.

Agradecimentos: Agradecemos a CAPES e ao CNPQ.

Antioxidantes na Criopreservação Seminal de Touros Nelore

Fernando de Castro Parizi[1]
Geraldo Francisco dos Santos Júnior[1]
Pedro Albuquerque de Lima[1]
Wallyson Rafael Machado Santos[1]
Jardel Carvalho da Silva[1]
Leonardo De Barros Pessoa[1]
Raí Dasmaceno Eleamen[1]
Sâmara Cristine Costa Pinto[2]
Jair Perez Osório[3]
Luciane Maria Laskoski[4]
Fernando Andrade Souza[4]
fernando.andrade@ufpr.br

Abstract: This study aimed to compare the concentrations of vitamin-C and glutathione as antioxidant agents in groups of both old and young bulls, respectively. Twelve ejaculates were collected from twelve different animals, being six young bulls (glutathione: 0, 1.25, 2.5 e 5.0 mM) and six old ones (Vitamin C: 0, 1.25, 2.5 e 5.0 mM). After the cryopreservation, functional tests were carried out to assess the thawed semen. Classes of bulls were not contrasted, only treatments were, inside each category, treating each group as a block. For the group of young bulls, there was no significant difference (P>0,05) between the results and the concentrations of glutathione. For the group of old bull (vitamin-C), on the contrary, the concentration of 5.0 mM presented unfavorable results compared to the other ones, which indicated an acrosomal membrane lesion, being contraindicated in this category of bulls.

Keywords: Freezing, Glutathione, Vitamin-C, Zebu.

Palavras-chave: Congelamento, Glutationa, Vitamina C, Zebu.

Introdução: Os processos de congelamento e descongelamento de sêmen causam danos estruturais, bioquímicos e, consequentemente, funcionais nos espermatozoides, os quais já se iniciam desde a colheita, onde o sêmen passa a ser exposto ao oxigênio [1]. Essa exposição promove o aumento de espécies reativas ao oxigênio (EROS). As EROS em excesso, sendo oriundas de maior exposição ao oxigênio ou por lesão celular, comprometem a viabilidade e funcionalidade dos espermatozoides. Dessa maneira, o uso de antioxidantes, tentando neutralizar os efeitos das EROS oriundas do processo de criopreservação, pode vir a melhorar a

[1] Universidade Federal do Acre.
[2] Universidade de São Paulo.
[3] Universidad de La Salle.
[4] Universidade Federal do Paraná.

viabilidade dos espermatozoides submetidos a este processo [2]. A glutationa pode agir como antioxidante por via da redução do peróxido de hidrogênio e pelos hidropeptídeos orgânicos, os quais a utilizarão como co-substrato da glutationa peroxidase, sendo um doador de elétrons, sendo regenerado pela glutationa redutase, pela doação de hidrogênio proveniente do NADPH [3]. Conjuntamente, a suplementação de diluidores espermáticos com a vitamina-C pode gerar efeito positivo sobre a funcionalidade espermática por reduzir os danos celulares pelo sistema contínuo de proteção contra os radicais livres [4]. Assim, buscando corroborar essas afirmativas, objetivou-se com este estudo determinar as respostas morfofuncionais das células espermáticas criopreservadas em meio diluidor acrescido de vitamina-C (touros velhos) ou glutationa (touros jovens).

Material e Métodos: Foram utilizados doze touros da raça Nelore, sendo divididos em dois grupos, touros jovens (n=6), com médias de idade e peso de 1,5 ano e 510 kg, e touros velhos, com 8 anos e 950 kg, respectivamente. Todos alocados no município de Rio Branco/AC, sendo previamente selecionados por exame andrológico de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Cada animal passou por uma colheita, sendo o ejaculado dos touros velhos diluídos com vitamina-C e dos touros jovens com glutationa. As colheitas foram feitas através de eletroejaculador (Boijector®), avaliando-se posteriormente o sêmen quanto as suas características, como: volume, cor, aspecto, turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática [5].

Após a colheita e avaliação prévia do sêmen, dividiu-se cada ejaculado em quatro frações iguais recebendo diluidor TRIS-GEMA na proporção de 1:1, sendo acrescidos de Glutationa no grupo de touros jovens (G1 - 0; G2 - 1,25; G3 - 2,5 e G4 - 5,0 mM/mL) e de Vitamina C no grupo de touros velhos (G5 - 0; G6 - 1,25; G7 - 2,5 e G8 - 5,0 mM/mL). Após as avaliações iniciais, determinou-se a concentração final por palheta em 25 x 10^6 de sptz. Assim, de acordo com cada tratamento e classe de touro, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e congelado em caixa de isopor com nitrogênio líquido segundo o preconizado por Forero-Gonzalez *et al.* [6].

Para a análise inicial, duas palhetas de sêmen de cada animal por tratamento, foram descongeladas a 37ºC por 30 segundos. A motilidade foi avaliada em duplo cego usando microscopia de contraste de fase. Para avaliação de membrana plasmática, utilizou-se o teste hiposmótico (HOST) segundo Brito *et al.* [7]. A longevidade das células espermáticas foi testada pelo TTRr segundo Vianna [8]. A determinação da viabilidade espermática foi realizada pelo método de coloração do azul de tripan e Giemsa [9].

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, não fazendo contraste entre categoria de idade animal, somente entre os tratamentos dentro de cada categoria. As variáveis passaram por teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo as paramétricas avaliadas por ANOVA e testadas pelo teste de Tukey e as não paramétricas pelo teste de Friedman. Todas as médias ou ranqueamentos foram comparados com significância de 5%. Uma vez que não se obteve interação entre classe de touros (velhos e jovens) e reagentes utilizados (vitamina-C ou Glutationa), tratou-se cada grupo como um bloco. Desta maneira, os dados aqui apresentados

não fazem contraste entre grupos e reagentes, mas sim das concentrações de cada reagente em cada grupo.

Resultados e Discussão: Não houve diferença estatística (P>0,5) no HOST entre os tratamentos, dentro de cada categoria animal. Esperava-se encontrar maior integridade da membrana plasmática em algum dos tratamentos efetuados, corroborando os achados de Oliveira *et al.* [10], que trabalhando com equinos, obtiveram melhor resultado utilizando a concentração de 2,5mM/mL. Contudo, não houve efeito sobre a integridade da membra plasmática das células espermáticas, isto tanto para a glutationa, em touros jovens, quanto para a vitamina C, em touros velhos.

Não houve diferença (p>0,05) nos valores do TTR quando se compararam dentro de cada intervalo as concentrações dentro de cada categoria, jovens e velhos. A média e desvio padrão dos momentos, inicial e final, para o grupo de glutationa e Vitamina C, são 42,76 ± 24,59 / 10,20 ± 13,39 e 35,81 ± 21,29 / 10,83 ± 15,18, respectivamente.

Um dos objetivos deste estudo foi buscar resultados que corroborassem que a integridade da membrana plasmática, assim como a motilidade espermática, poderia ser melhor protegida frente ao antioxidante utilizado dentro de cada categoria animal. A vitamina-C tem forte ação antioxidante, previnindo a oxidação da bicamada lipídica espermática, assim como a glutationa está relacionada como o primeiro sistema de defesa intracelular contra EROS e radicais livres [11]. Os resultados obtidos no Teste Giemsa e Azul de Tripan, contabilizando os espermatozoides vivos com e sem acrossoma, são representados na tabela 01.

Houve diferença (P<0,05) entre vivos, com e sem acrossoma, dentro dos grupos de touros jovens e velhos. Touros jovens não apresentaram diferença (P>0,05) dentro de cada variável comparando-se tratamentos. Já nos touros velhos, o tratamento 8 (5,0 mM/mL) apresentou diferença dos demais, tendo menor número de vivos com acrossoma, demonstrando maior reação acrossomal desta categoria, o que pode indicar, menor taxa de fertilidade por aumentar o número de defeitos não compensatórios frente aos demais tratamentos.

Tabela 01: Média e desvio padrão ($\bar{x}$±SD) das células espermáticas vivas, com e semacrossoma, dos touros congelados com os antioxidantes e coradas pelo Giemsa/azul de tripan.

TOUROS	TRATAMENTO	VIVO COM ACROSSOMA	VIVO SEM ACROSSOMA
JOVENS (Glutationa)	1	44,66 ± 8,09a	32,00 ± 6,16b
	2	47,16 ± 9,70a	27,83 ± 9,68b
	3	44,83 ± 7,41a	26,50 ± 13,57b
	4	44,8 3± 4,49a	28,83 ± 9,53b
VELHOS (Vitamina C)	5	57,16 ± 3,92Ba	3,16 ± 0,75b
	6	56,33 ± 3,38Ba	2,66 ± 1,21b
	7	56,00 ± 4,89Ba	6,5 ± 6,83b
	8	49,83 ± 2,56Aa	7,16 ± 9,26b

Letras maiúsculas e minúsculas distintas na mesma coluna e linha, respectivamente, diferem (p<0,05) pelo teste de Tukey. 1: Controle; 2:1,25 mM/mL; 3: 2,50 mM/mL e 4: 5,00 mM/mL.

Conclusões: A adicição de glutationa no meio extensor de congelamento utilizada em touros jovens não proporciou nenhuma melhora da qualidade espermártica, independe da variável analisada. Já a adição de vitaminca C em touros velhos, na concentração de 5 mM/mL, foi lesiva a membrana acrossomal.

Referências bibliográficas

[1] AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. Equine Vet Sci. 1987;7:145-173.

[2] ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. Rev Inst Adolfo Lutz 2007; 66:232-40.

[3] SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. Theriogenology. 2006; 65:958-78.

[4] SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. Rev port ciênc vet, 2012; 111:143-149.

[5] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3. ed. Belo Horizonte; 2013.

[6] FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; BRESSAN, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. Andrologia (Berlin), v. 44, p. 154-159, 2012.

[7] BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. Theriogenology. 2003;60:1539-1551.

[8] VIANNA, F. P. Eficiência dos testes de termoresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina. – Botucatu: [s.n.], 2004.

[9] FELICIANO SILVA, A. E. D. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 38p. (Embrapa Recursos Genéticos, Documentos, 35).

[10] OLIVEIRA, R. A.; WOLF, C. A.; VIU, M. A. O.; GAMBARINI, A. Addition of glutathione to an extencer for frozen equine. J. Eq. Vet. Sci. 2013;33:1148-1142.

[11] CABALLERO, B. Antioxidant nutrients, Phd thesis, Johsis Hopkins, University; USA (2007).

Efeito do tempo de coloração da eosina-nigrosina na avaliação da integridade de membrana de espermatozoides equinos

Ana Beatriz Marques de Almeida[1]
beatriz.marques@uel.br
Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo[1]
Luiz Guilherme Corsi Trautwein[1]
Josiana de Fátima Schinitzer[1]
Beatriz Canabrava Garrido[1]
Maria Isabel Mello Martins[1]
imartins@uel.br

Abstract: The study aimed to assess the membrane integrity of the equine spermatozoa at 5, 15 and 30 minutes after sperm smears was stained, in order to observe whether the time of spermatozoa exposure to the dye promotes the absorption of the ink. For this purpose, ten semen straws were thawed, for making smears on slides stained with eosin-nigrosine. It was analyzed 200 spermatozoa from each slide under optical microscopy. It was possible to verify that the amount of sperm with damaged membrane increased when the evaluation took place at 30 minutes comparing with the analysis conducted at 5 minutes. However, the percentage of sperm with damaged membrane at the time of 15 minutes did not differ significantly from moments 5 and 30 minutes. It was concluded that the integrity evaluation of equine sperm membrane performed with smears stained in eosin-nigrosine should be conducted within 15 minutes after making the slides.

Keywords: horse, membrane injury, supravital dye.

Palavras-chave: cavalo, corante supravital, lesão de membrana.

Introdução – O crescente uso do sêmen criopreservado na espécie equina exige doses espermáticas de alta viabilidade, para isto, as análises realizadas *in vitro* devem ser mais acuradas para que reflitam a real qualidade espermática [1]. A membrana plasmática tem função de realizar trocas metabólicas com o meio diluidor [2], além de ser observada uma relação entre a integridade da membrana com a motilidade espermática [3]. A avaliação da integridade da membrana pode ser feita por meio de sondas fluorescentes, no entanto, para a execução desta metodologia são necessários microscópios de epifluorescência ou citometria de fluxo, equipamentos de alto custo e que exigem treinamento técnico [1,4]. Neste contexto, a eosina nigrosina é uma alternativa mais acessível em decorrência de seu baixo valor financeiro aliado a sua facilidade de avaliar a integridade da membrana espermática, pois este corante supravital cora o DNA espermático ao penetrar a porção pós-acrossomal de membranas lesa-

[1] LARAA-UEL: Laboratório de Andrologia e Reprodução Animal Assistida da Universidade Estadual de Londrina.

das [1]. A análise da integridade de membrana espermática com eosina-nigrosina é realizada com o uso de um microscópio óptico, assim, os espermatozoides com coloração branca são classificados como íntegros e os róseos são considerados com lesão de membrana [1]. Apesar dos fatores favoráveis ao uso da eosina-nigrosina, o tempo de exposição dos espermatozoides ao corante pode gerar alterações na permeabilidade de membrana, e assim, proporcionar valores incorretos acerca da porcentagem de espermatozoides com membrana lesada [1,5]. Por isso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a integridade da membrana plasmática de espermatozoides equinos criopreservados sob coloração de eosina-nigrosina por até 30 minutos de exposição ao corante.

Material e Métodos – Foram avaliadas dez doses de sêmen criopreservado, provenientes de um único garanhão, com partidas diferentes. Todas as amostras utilizavam o mesmo extensor comercial para congelação de sêmen equino, e apresentavam concentração de $150x10^6$ espermatozoides/ml. As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37ºC por 30 segundos. As amostras avaliadas para integridade de membrana continham o diluente, pois a centrifugação realizada para separar o extensor poderia induzir danos à de membrana espermática [6], e desta forma iria comprometer os resultados encontrados. Para a confecção dos esfregaços em lâmina corada, foi depositada uma alíquota de 3µL da amostra seminal sobre uma lâmina de vidro, seguida pela deposição de uma gota de 3µL do corante eosina-nigrosina (BotuVital®, Botupharma, Botucatu – SP) e realização do esfregaço. A integridade da membrana espermática foi avaliada por meio da observação de 200 espermatozoides por lâmina, sob microscopia óptica com aumento de 1000 vezes e auxílio do óleo de imersão. A avaliação da integridade de membrana espermática foi realizada nos momentos 5, 15 e 30 minutos após a confecção dos esfregaços corados. Os espermatozoides considerados com lesão de membrana apresentavam coloração rósea, e os resultados foram fornecidos em porcentagem. Os dados referentes à porcentagem de espermatozoides equinos com membrana lesada passaram pelo teste de Shapiro-Wilk e teste de Levene, os quais garantiram a distribuição normal ($p=0,37$) e a homogeneidade das variâncias ($p=0,65$) dos dados. Em seguida, foi conduzida uma análise de regressão linear, para confirmar a influência do tempo sobre as lesões de membrana observadas. Por fim, os dados obtidos para lesão de membrana espermática passaram pela análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas no software SigmaPlot 12.0, e considerou-se significância quando $p<0,05$.

Resultados e Discussão – O tempo de exposição dos espermatozoides à eosina-nigrosina influenciou positivamente a porcentagem de membranas lesadas ($p=0,023$; $R^2= 0,41$). Observou-se que a porcentagem de membranas lesadas foi significativamente maior quando os espermatozoides foram analisados após 30 minutos da confecção de esfregaços corados com eosina-nigrosina, quando comparada à avaliação realizada aos 5 minutos (30 min.:71,1% *vs.* 5 min.:62,7%; $p=0,011$). Entretanto, a análise de membrana realizada aos 15 minutos de exposição ao corante, não diferenciou significativamente com o momento 30 minutos (30min.: 71,1% *vs.* 15min.: 68,6%; $p=0,59$) e nem com o momento 5 minutos (15min.: 68,6% *vs.* 5min.: 62,7%; $p=0,07$), conforme exposto na Tabela 1.

Tabela 1. Espermatozoides equinos com membrana lesada após 5, 15 e 30 minutos da confecção do esfregaço corado.

Tempo de Exposição	Média (%) ± desvio padrão
5 minutos	62,7±9,8[a]
15 minutos	68,6±7,0[ab]
30 minutos	71,1±5,0[b]

[a,b]- Letras diferentes indicam diferença estatística entre grupos, p<0,05.

A eficácia da eosina-nigrosina como metodologia para a avaliação da integridade de membrana espermática de equinos foi previamente validada e demonstrou concordância com os resultados obtidos pela citometria de fluxo [1]. O presente estudo corrobora com o de Naumenkova *et al.* [3] que comprovou a praticidade e confiabilidade do corante eosina-nigrosina para avaliar a integridade da membrana de espermatozoides equinos, pois a análise feita por meio desta coloração demonstrou relação com a motilidade espermática, além de possibilitar a visualização de patologias morfológicas simultaneamente. O aumento de lesões em membrana espermática após 15 minutos de exposição ao corante, encontrado no presente estudo, foi similar aos achados em espermatozoides suínos, os quais apresentaram menor porcentagem de membranas intactas ao longo do tempo [7]. Em estudo com espermatozoides humanos, onde as avaliações de integridade de membrana espermática foram realizadas até 5 minutos após a confecção do esfregaço não foi observada influência do tempo de exposição das células à eosina-nigrosina [8], um período curto para notar alguma alteração decorrente do corante. Têm- se conhecimento que a eosina possui um pH ácido, desta forma a concentração e o tempo de exposição dos espermatozoides equinos ao corante interferem na viabilidade da membrana espermática [9] e explicam as diferenças observadas no presente estudo.

Considerações Finais – Nas condições do presente estudo, concluiu-se que a análise da integridade de membrana dos espermatozoides equinos sob a eosina-nigrosina deve ser realizada em até 15 minutos após a confecção dos esfregaços corados, com intuito de impedir a ocorrência de um viés metodológico.

Referências bibliográficas

[1] Foster, M. L.; Love, C. C.; Varner, D. D.; Brinsko, S. P.; Hinrichs, K.; Teague, S. *et al.* Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. Theriogenology 2011;76:334–41. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.012.

[2] LAGARES, M. A.; MEIRELES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozóide eqüino e fertilidade do sêmen resfriado Effect of different extenders on sperm plasma membrane and fertility of equine cooled semen. Rev Bras Ciência Veterinária 2000;7:153–6.

[3] Naumenkova, V. A.; Atroshchenko, M. M.; Gulov, A. N.; Shirokova, O. V.; Frolova, N. A. Comparative Evaluation of Different Methods for Assessing Stallion Sperm Membrane Integrity. Russ Agric Sci 2020;46:381–4. https://doi.org/10.3103/s1068367420040126.

[4] Foster, M. L.; Varner, D. D.; Hinrichs, K.; Teague, S.; LaCaze, K.; Blanchard, T. L. *et al.* Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. Theriogenology 2011;75:1499–505. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.011.

[5] Björndahl, L,.; Söderlund, I.; Johansson, S.; Mohammadieh, M.; Pourian, M. R.; Kvist, U. Why the WHO recommendations for eosin-nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. J Androl 2004;25:671–8. https://doi.org/10.1002/j.1939- 4640.2004.tb02839.x.

[6] Alvarenga, M. A.; Papa, F. O.; Carmo, M. T.; Kievitsbosch, T.; Castro Chaves, M. M. B.; Ramires Neto, C. Methods of Concentrating Stallion Semen. J Equine Vet Sci 2012;32:424–9. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.003.

[7] Brito, L. F. C.; Barth, A. D.; Bilodeau-Goeseels, S.; Panich, P. L.; Kastelic, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. Theriogenology 2003;60:1539–51. https://doi.org/10.1016/S0093- 691X(03)00174-2.

[8] Björndahl, L.; Söderlund, I.; Kvist, U. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Hum Reprod 2003;18:813–6. https://doi.org/10.1093/humrep/deg199.

[9] Almadaly, E.; Farrag, F.; Shukry, M.; Murase, T. Plasma Membrane Integrity and Morphology of Frozen-Thawed Bull Spermatozoa Supplemented with Desalted and Lyophilized Seminal Plasma 2014;13:753–66. https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.13.05.8684.

Agradecimentos: à CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Estimativa de repetibilidade de touros da raça Nelore (*bos indicus*) nas variáveis relacionadas a produção *in vitro* de embriões

Marina de Oliveira Silva[1]
marinadeoliveira.silva21@gmail.com
Jaine Martelo Pagoto[2]
Luana Gomes Fernandes[2]
Marcelo Sant`Ana Borges[1]
Naiara Nantes Rodrigues[2]
Fabio Morato Monteiro[1,2]
fabiomoratomonteiro@yahoo.com.br
Yeda Fumie Watanabe[3]
Daniel Carlino Joaquim[3]
Maria Eugênia Zerlotti Mercadante[1,2]

Abstract: The aim of the present study was to evaluate the repeatability of Nellore bulls in variables related to *in vitro* embryo production (IVPE). For data analysis, the results of 292 follicular aspirations guided by ultrasound (OPU) were used in 97 Nellore donors in the years 2018 to 2020. For *in vitro* fertilization, cryopreserved semen of 7 Nellore bulls was used. Low repeatability among bulls and high repeatability among donors was observed in variables related to IVPE. There was no significant variance among bulls for cleaved oocytes and embryos produced by OPU, indicating that the bulls used did not interfere in the final result of IVPE. However, when analyzing the donors, significant variance was observed, indicating that females interfere in IVPE. It is concluded that the use of bulls for IVPE has little variation and low repeatability among individuals of the same breed, different from that observed in donors.

Keywords: cattle; fertility; semen

Palavras-chave: bovinos; fertilidade; sêmen.

Introdução – Com o aumento na demanda por carne bovina têm se buscado meios para aumentar a produção em um curto período de tempo. Com isso se torna necessário a utilização de técnicas de multiplicação de animais com alto mérito genético para produção de carne mais precocemente. Nesse âmbito encontra-se a utilização de biotecnologias da reprodução, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que assegura a obtenção de animais geneticamente superiores em menor intervalo. Entretanto, existem algumas dificuldades para se

[1] Centro Avançado de Pesquisa de bovinos de corte (Instituto de Zootecnia).
[2] UNESP- FCAV.
[3] Vitrogen.

obter sucesso na PIVE como a escolha da doadora e do touro utilizado para a fertilização *in vitro* (FIV) uma vez que pode existir variação individual nos resultados finais da PIVE [1]. Com isso se torna necessário o conhecimento da variação dentro e entre animais para que se tenha êxito na utilização da técnica, aumentando assim o número de animais geneticamente superiores. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a repetibilidade de touros e de doadoras nas variáveis relacionadas a clivagem e desenvolvimento em blastocistos.

Material e Métodos – As OPUs das doadoras foram realizadas no Instituto de Zootecnia (Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte) situado no município de Sertãozinho/SP/Brasil e a etapa de produção *in vitro* de embriões na Vitrogen® (Cravinhos, SP, Brasil). Foi utilizado sêmen criopreservado da mesma partida de 7 touros da raça Nelore. Para a obtenção dos oócitos foram aspiradas 97 doadoras da raça Nelore com idade entre 13 e 86 meses nos anos de 2018 a 2020. Para verificar a influência na PIVE, sêmen dos reprodutores foram submetidos a fecundação *in vitro*, sendo que em 2018 foram utilizados três touros com 30 doadoras em 2 replicatas, em 2019 foram utilizados três touros (dois deles já utilizados no ano anterior) com 36 doadoras em três replicatas, e em 2020 foram utilizados três touros com 31 doadoras em quatro replicatas. Todos os touros passaram com todas as doadoras em seu respectivo ano. O sêmen criopreservado foi preparado mediante a técnica de Percoll para obtenção de espermatozoides móveis, remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração foi ajustada para $1x10^6$ sptz/ml. O meio utilizado na fecundação foi o meio Tyrodes modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10 µg/ml de heparina. Os gametas permaneceram incubados em placas com microgotas de 70 µl cobertas com óleo mineral, por 20-22 horas a 38,5º com alta tensão de oxigênio ($5\%CO_2+20\%O_2$). Após o tempo de incubação, os prováveis zigotos foram lavados para retirar o excesso de células *cumulus* e transferidos para uma placa de 5 poços com 500 µl de meio de cultivo (CR2 modificado acrescido de SFB e BSA), e cobertos por óleo mineral. Estes permaneceram na incubadora de bancada *(*EVE- WTA®,Brasil*)* por 7 dias, sendo mantidos a temperatura de 38,5ºC com baixa tensão de oxigênio ($6\%CO_2 + 5\%O_2 + 89\%N_2$) e pressão hidrostática de 5mmHg. Após 72 horas foi realizado a contagem das estruturas clivadas e a taxa de clivagem (número de estruturas clivadas/números de oócitos viáveis). A contagem de embriões produzidos e a taxa de blastocistos (número de embriões produzidos/números de embriões clivados) foi obtida em D7. Os resultados obtidos foram analisados com auxílio do programa "Statistical Analysis System" (SAS), utilizando o procedimento MIXED ou GLIMMIX, sendo utilizada no primeiro procedimento a ferramenta COVTEST para determinar o erro padrão assintótico e teste Z de Wald para a estimativa do componente de variância. Foi ajustado o seguinte modelo estatístico: y= µ + ano + replicata + categoria de idade + ano x replicata + ano x categoria de idade + replicata x categoria de idade + e, em que, y = variável resposta; µ = média geral; ano = efeito fixo do ano de avaliação (i=1, 2, 3); replicata = efeito fixo da PIVE (j= 1, 2 ou j= 1, ..., 3 ou j= 1, ...,4, dependendo do ano de avaliação); categoria de idade = efeito fixo da idade da doadora (k= 12, 24, ≥36 meses); e = erro aleatório. O efeito de touro (l= 1, ..., 7) ou de doadora (m= 1, ..., 97) foi considerado como efeito aleatório.

Resultados e Discussão - A repetibilidade de touros para as variáveis relacionadas a PIVE apresentaram-se baixas quando comparado a repetibilidade de doadoras para as mesmas variáveis (Tabela 1), com exceção para a taxa de clivagem e taxa de blastocisto, cujas repetibilidades foram baixas tanto para touros como para doadoras A baixa repetibilidade de touros é devido a baixa variação entre touros e alta variação entre repetições de um mesmo touro. O mesmo foi observado por Cyrillo *et al.* [1] que relataram que a variância entre touros representou somente 1,13% e 7,8% da variância total para produção de embriões e taxa de embriões. Não houve variância significativa entre touros para o número de embriões clivados e blastocistos produzidos por OPU, indicando que os touros utilizados não interferiram no resultado final da PIVE.

Tabela 1- Componentes de variância ± erro padrão e estimativa de repetibilidade de touros e de doadoras para as variáveis relacionadas a PIVE

Variável	Pr>Z	σ^2	σ^2_e	r
		Touros		
Estruturas Clivadas (n)	0,16	9,78±10,13	123,54±10,73	0,07
Taxa de Clivagem (%)	-	0,14±0,11	2,65±0,23	0,05
Blastocistos por OPU (n)	0,15	4,09±4,07	49,66±4,31	0,07
Taxa de Blastocisto (%)	-	0,06±0,05	2,33±0,20	0,02
		Doadoras		
Estruturas Clivadas (n)	0,0001	131,04±24,56	36,76±3,71	0,78
Taxa de Clivagem (%)	-	0,21±0,07	2,22±0,22	0,08
Blastocistos por OPU (n)	0,0001	47,55±9,35	18,72±1,90	0,71
Taxa de Blastocisto (%)	-	0,14±0,04	1,91±0,18	0,06

σ^2: variância; σ^2_e: variância residual; r: repetibilidade

Diferente dos touros, as doadoras apresentaram alta repetibilidade nos valores de estruturas clivadas (0,78) e blastocistos por OPU (0,71), devido à alta variabilidade entre as doadoras e a baixa variabilidade dentro de repetições de uma mesma doadora, estimado pela variância residual. Esses resultados corroboram com o encontrado por Monteiro *et al.* [2], que observaram alta repetibilidade para o número de blastocistos produzidos por OPU (0,79) utilizando doadoras da raça Nelore. A alta variabilidade entre doadoras pode influenciar nos resultados finais da PIVE [3]. Diferente dos resultados obtidos para touros, foram verificadas variâncias significativas entre doadoras para embriões clivados e blastocistos por OPU, indicando que a utilização das doadoras na PIVE interfere nos resultados finais.

Considerações Finais – Diante da metodologia proposta, conclui-se que a utilização de touros para PIVE apresenta pouca variação entre indivíduos da mesma raça e baixa repetibilidade, diferentemente do observado nas doadoras.

Referências bibliográficas

[1] Cyrillo, J. N. S. G.; Monteiro, F. M.; Ribeiro, E. G.; Mercadante, M. E. Z.; Bonilha, S. F. M.; Branco, R. H. Fatores que influenciam a produção de embriões *in vitro* em bovinos da raça Nelore. In: Sociedade Brasileira de Zootecnia,49, 2012, Brasília, DF. *Anais*... Brasília: SBZ 2012.

[2] Monteiro, F. M.; Batista, E. O. S.; Vieira, L. M.; Bayeux, B. M.; Accorsi, M.; Campanhol, S. P.; Dias, E. A. R.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more *in vitro* embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology* 2017; 54:58-90. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002

[3] Watanabe, Y. F.; Souza, A. H.; Mingoti, R. D.; Ferreira, R. M.; Batista, E. O. S.; Dayan, A.; Watanabe, O.; Meirelles, F. V.; Nogueira, M. F. G.; Ferraz, J. B. S.; Baruselli, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with *in vitro* embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction* 2017; 635:644-14. doi: 10.21451/1984-3143-AR1008

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001) pela bolsa concedida a primeira autora e a equipe da Vitrogen pelo excelente trabalho prestado.

Polimorfismo do gene do hormônio do crescimento associado à precocidade sexual em machos jovens Nelore

Vitor Miotto Oliveira[1, 2]
vitormioli@hotmail.com
Luiz Carlos Cesar da Costa Filho[2]
Fernanda Battistotti Barbosa[1,2]
Thaynádia Gomes Rios[1]
Herbert Patric Kellermann Cleveland[3]
Gustavo Guerino Macedo[4]
Carlos Alberto Nascimento Ramos[3]
Eliane Vianna da Costa e Silva[4*]
eliane.silva@ufms.br
*Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul, GERA-MS/CNPq

Abstract: The correlation between alleles´ bGH gene with characteristics of sexual precocity and performance were evaluated in young Nelore male (n=108, since monthsold). They were submitted to weighing, testicular circumference weaning until 17 (SC) and semen collection. Genetic material was also collected through the puncture of the coccygeal vein, and it was processed using the PCR-RFLP technique to evaluate the polymorphism of the bGH gene. It was verified the associations between genotypes and phenotypic characteristics, the effect of total genetic merit and the percentile of best animals (by ANCP genetic evaluation program). Three different genotypes for bGH were found: CC, CD and DD. Only a significant and favorable associations ofage and weight to puberty characteristics with DD genotype, demonstrating that the animals in this group reached puberty on average one month earlier than the genotypes CC and CD, and with a lower average weight.

Keywords: bovine, puberty,MAS.

Palavras-chave: bovino, puberdade, SAM.

Introdução - A relevância do touro na pecuária requer que atenção seja dada à seleção desses animais, não só pela abordagem do melhoramento genético, como também pela perspectiva do potencial biológico reprodutivo[1]. As ferramentas de análise de marcadores moleculares podem auxiliar os PMG dando mais confiabilidade na tomada de decisão relacionada a escolha dos animais mais precoces. As características reprodutivas de machos e fêmeas têm

[1] Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS.

[2] Médicos Veterinários, ProcriarAssistência Zootécnica e Veterinária.

[3] Laboratório de Biologia Molecular, FAMEZ/UFMS, Campo Grande/MS, Brasil.

[4] Laboratório de Reprodução Animal, FAMEZ/UFMS, Campo Grande/MS, Brasil.

natureza poligênica, a apresentando dores importantes associados com estas características em 30 cromossomos [2].Em machos de várias raças, resultados divergentes foram encontrados: observou-se associação entre alelos do gene *bGH* com as características de biometria testicular e qualidade de sêmen [3,4,5]; entretanto, em outros trabalhos, mapeando o genoma bovino e utilizando painéis de alta resolução, o gene *bGH* e sua região cromossômica não foram citados como regiões importantes para seleção de características reprodutivas [6,7]. O objetivo nesse trabalho foi averiguar a correlação entre alelos do gene *bGH* com características de precocidade sexual e de desempenho em animais machos da raça Nelore.

Material e Métodos - Participaram das avaliações 108 bovinos machos da raça Nelore, inicialmente entre 7 a 13 meses, após desmama, avaliados a cada 90 dias por um ano (quatro avaliações), coincidindo com as pesagens corporais oficiais de programas de melhoramento genético. A avaliação da genitália externa foi realizada de acordo com a metodologia proposta por [8]. Ao atingirem 19 cm de perímetro escrotal (PE), os animais foram submetidos ao processo de eletroejaculação para avaliação seminal quanto aos aspectos físicos, seguindo-se a preparação de alíquota para avaliação da concentração espermática. A cinética espermática foi estimada subjetivamente pela motilidade (MOT, %) e vigor (VIG, 0 - 5), em microscopia simples [8]. Considerou-se púberes, os animais que apresentaram MOT ≥ 10% e no mínimo 50 milhões de espermatozoides totais no ejaculado [9]. Após as análises, os tourinhos foram classificados de acordo com a idade à puberdade em: superprecoces (SP – púberes até 14 meses), precoces (P – púberes entre 14 e 17 meses) e tradicionais (Trd –acima de 17 meses). As amostras de sangue dos animais foram coletadas através da punção da veia coccígea em tubos para coleta à vácuo contendo EDTA, e processadas no Laboratório de Biologia Molecular da FAMEZ/UFMS. As amostras foram então submetidas a extração de DNA conforme descrito por [10]. A integridade e qualidade das amostras de DNA obtidas foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e espectrofotometria (A260/A280) em *NanoDropOneC* (Thermo Fischer Scientific). A genotipagem dos animais quanto aos alelos do gene *bGH* foi realizada por PCR-RFLP conforme descrito por [11]. *Análise estatística***:** As frequências dos alelos do gene do GH foram calculadas por contagem simples dos alelos [12]. Examinou-se os possíveis desvios das frequências alélicas e genotípicas do equilíbrio de Hardy-Weinberg por teste de Qui-quadrado. A associação entre os genótipos e as características fenotípicas, Peso a puberdade, PE à puberdade, MOT, VIG, volume do ejaculado (VOL), concentração do ejaculado (CONC, expressa em sptz/ml) e idade à puberdade (IDPub), o efeito do mérito genético total (MTGe) e o percentil de melhores animais (TOP) pertencentes ao programa da ANCP, foi avaliada por análise de variância de um fator (ANOVA), com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES *et al*., 2007).O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo nº 1040/2019.

Resultados e Discussão - Três genótipos diferentes para o *bGH* foram encontrados, sendo eles: CC, CD e DD. O genótipo encontrado com maior frequência foi o DD (57,4%), seguido pelo CD (23,1%) e por último CC (19,4%). O alelo D foi mais frequente que o alelo C (0.694 vs. 0.305). De acordo com as frequências genotípicas observadas a população não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados da análise de associação entre os

genótipos encontrados e as características reprodutivas são demonstrados na Tabela 1.Não foram encontradas associações significativas entre os genótipos e o PE, CONC, volume do ejaculado, VIG, MOT, MGTe e TOP. No entanto, com relação à característica de IDpub e peso a puberdade, foram observadas associações significativas, e favoráveis ao genótipo DD, demonstrando que os animais desse grupo atingiram a puberdade em média um mês mais cedo que os grupos de genótipos CC e CD, e com um peso médio menor.

Tabela 1. Efeito dos genótipos para o gene *bGH* sobre as características analisadas e associadas a precocidade sexual em machos Nelore.

Fenótipo	**bGH Genótipo**			
	CC(n=21)	CD(n=25)	DD(n=62)	P- *value*
Peso a puberdade (kg)	358.71 ± 63.59	395.32 ± 67.83	349.99 ± 55.52	0.0076*
PE (cm)	28.5 ± 3.13	28.76 ± 2.98	27.42 ± 3.05	0.1192
Motilidade (MOT-%)	31.11 ± 20.26	35.91 ± 22.39	33.81 ± 17.64	0.7341
Vigor (VIG - 1-5)	1.61 ± 0.78	1.77 ± 0.92	1.73 ± 0.81	0.8191
CONC (sptz/ml)	8.44×10^8	1.29×10^9	8.52×10^8	0.0880
Volume ejaculado (ml)	10.67 ± 1.86	10.91 ± 1.78	10.17 ± 2.03	0.2691
Idade a Puberdade (meses)	16.78 ± 2.36	17.06± 1.71	15.84 ± 2.17	0.0482*
TOP (%)	4.85	3.42	3.63	0.2027
MTGe	14.61	16.01	15.99	0.1263

*Diferença significativa (One-Way ANOVA)

Os resultados observados no presente estudo demonstraram maior frequência do Alelo D, próxima de 70% em relação ao alelo C em machos Nelore dessa propriedade no Mato Grosso do Sul. Esse achado é similar ao encontrado por [13], que ao avaliar uma população Nelore encontrou o alelo D em uma frequência de 85% dos bovinos. Já em outros estudos, realizados com raças taurinas, observou-se maior frequência do alelo C [14,15,3], assim como associações significativas entre características produtivas, tais como volume espermático, CONC, MOT no sêmen fresco, e MOT pós descongelamento e o genótipo CC. Segundo os autores essa diferença encontrada entre raças seria devido ao alelo C ser associado à maior produtividade dos taurinos, e o Alelo D à maior adaptação ambiental dos zebuínos. O rebanho utilizado neste trabalho faz seleção para precocidade sexual há muitos anos, e isso pode ter levado à mudança da frequência dos alelos, o que explicaria a maior frequência do alelo D.O peso a puberdade dos animais do genótipo DD foi significativamente menor devido a entrada à puberdade ocorrer mais cedo. Assim sendo, os outros genótipos apresentaram peso médio maior devido ao maior tempo transcorrido até a puberdade.Com relação ao efeito do genótipo ligado as características reprodutivas, os resultados encontrados foram semelhantes ao citado por [13], não sendo encontrada nenhuma associação significativa do genótipo com PE, MOT, VIG, volume e CONC. Já[3, 4,5] encontraram correlação entre o genótipo CC e as características de biometria testicular e qualidade de sêmen, o que pode ser explicado por conta de diferença entre raças zebuínas e taurinas. Apesar de não ter sido encontrada nenhuma associação das variáveis seminais e da PE, a idade a puberdade teve sua associação positiva com os animais do genótipo DD. Os animais do genótipo DD entraram em puberdade em média 1 mês mais cedo que os animais dos outros genótipos, dessa forma mais animais desse grupo foram classificados como SP (25%) e como P (46,4%) e Trd (28.5%) em comparação

com o genótipo CC(9.5, 47,6e 42,8%) ou os CD (4,5, 40,9 e 54,4%).O alelo D é mais frequente nos animais zebuínos do que nos taurinos, e como relatado por [3], poderia estar correlacionado com uma maior adaptação ambiental, diferente do alelo C que estaria correlacionado com uma maior produtividade ligada aos taurinos. Porém, nesse estudo os animais mais produtivos, ou seja, os que entraram em puberdade mais cedo foram os homozigotos DD. Esse achado pode nos levar a entender que uma maior adaptabilidade pode fazer com que os animais consigam expressar melhor seu potencial produtivo.

Considerações Finais – O gene do bGH é um gene candidato que poderá, junto com os demais genes já conhecidos, ser utilizado para formar os marcadores de precocidade sexual em bovinos.

Referências bibliográficas

[1] Costa-E-Silva, E. V.; Costa-Filho, L. C. C.; Souza, C. C. *et al.* Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. Rev Bras ReprodAnim 2015; 39,1:22-31.

[2] Fortes, M. R. S.; Reverter, A.; Kelly, M. *et al.* Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. Andrology 2013; 1:644–650.

[3] Gorbani, A.; Torshizi, R. V.; Bonyadi, M. *et al.* Restriction fragment length polymorphism of bovine growth hormone gene intron 3 and its association with testis biometry traits in Iranian Holstein bull. African J Microb Res, 2009; 3:809-814.

[4] Afshar, K. P.; Javanmard, A.; Asadzadeh, N. *et al.* Association between GH encording gene polymorphism and semen characteristics in Iranian Holstein bulls. African Journal of Biotechnology. 2011;10:882-886.

[5] Pal, A.; Chakravarty, A. K.; Chatterjee, P. N. Polymorphism of growth hormone gene and its association with seminal and sexual behavioral traits in crossbreed cattle. Theriogenology, v. 81, p. 474-480, 2014.

[6] Utsunomiya, Y. T.; Carmo, A. S.; Neves, H. H. R. *et al.* Genome-Wide Mapping of Loci Explaining Variance in Scrotal Circumference in Nellore Cattle. Plos One, 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088561

[7] Melo, T. P.; Fortes, M. R. S.; Fernandes Jr, G. A. *et al.* Multi-breed validation study unraveled genomic regions associated with puberty traits segregating across tropically adapted breeds. Oxford University Press, 2019.

[8] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3. ed. Belo Horizonte; 2013.

[9] Wolf, F. R.; Alquimist, J. O.; Hale, E. B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. J Anim ci. 1965;224:3,761-765. https://doi.org/10.2527/jas1965.243761x.

[10] Araújo, F. R.; Ramos, C. A. N.; Luiz, H. L. *et al.* Avaliação de um protocolo de extração de DNA genômico a partir de sangue total. EMBRAPA, Comunicado Técnico, Campo Grande, 2009.

[11] Zhang, H. M.; Maddock, K. C.; Brown, D. R. *et al.* A novel allele of the bovine somatotropin gene detected by PCR-RFLP analysis. J Animal Sci, 1993;71:2276.

[12] Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. Introduction to Quantitative Genetics. 4. ed Longman Group Ltd, Essex, England, 1996.

[13] Unanian, M. M.; Barreto, C. C.; Cordeiro, C. M. T. *et al.* Possible association between bovine growth hormone gene polymorphism and reproductive traits. Braz. Arch. Boil. Tech. v.45, p.293-299, 2002.

[14] Zakizadeh, S.; Rahimi, G.; Mirae-Ashtiani, S. R. *et al.* Analysis of Bovine Growth Hormone Gene Polymorphisms in Three Iranian Native Breeds and Holstein Cattle by RFLP-PCR. Biotechnology, 2006;5:385-390.

[15] Pawar, R. S.; Tajane, K. R.; Joshi, C. G. *et al.* Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. Indian J Animal Sci,2007; 77:884-888.

Agradecimentos - À Procriar Assistência Zootécnica e Veterinária pela cessão dos dados. Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código financeiro 001.

Quercetin, Carnosine and Ozone in the cryopreservation of bovine semen

Willian Vaniel Alves dos Reis[1]
willian.alves@ufms.br
Mozarth Vieira Junior[1]
Raiza Rocha Pereira[1]
Bianca Rodrigues Acacio[2]
Eliane Vianna da Costa e Silva[3]
Gustavo Guerino Macedo[3]
Breno Fernandes Barreto Sampaio[2,3]
breno.sampaio@ufms.br
*Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul, GERA- MS/CNPq

Abstract: The present experiment aimed to reduce the effects of cryoinjury caused to bovine semen as a result of the cryopreservation process, by adding quercetin, carnosine or ozone to the diluent for freezing. The samples were evaluated post-thaw (M0) and post-TTR (M30) via a computerized semen analysis system and flow cytometry. There was no statistical difference between the treatments and control, for the parameters evaluated at M0 and M30. Ozone supplementation, although it expressed lower results for sperm kinetics and lower mitochondrial potential in M30, did not harm the other cellular structures evaluated. It is concluded that quercetin and carnosine in the concentrations used does not promote significant gains to frozen semen, nor did it demonstrate cytotoxicity. However, ozone in the adopted concentrations does not improve the parameters of sperm kinetics, and its paradoxical effect is not observed as an antioxidant for these characteristics.

Keywords: lipid peroxidation; reactive oxygen species; spermatozoa.

Palavras-chave: peroxidação lipídica; espécies reativas de oxigênio; espermatozoide.

Introduction – Due to the semen dilution process for cryopreservation, there is a reduction in the availability of these antioxidants, which can culminate in an increase in the production of ROS [1]–[3]. For this reason, the effect of supplementing antioxidants to dilution media for preparing, maintaining and cryopreserving sperm has been studied, in order to reduce the effects caused by this possible imbalance [4].

Quercetin flavonoid has been studied as a potent enzymatic antioxidant [5]. Its activity has already been described for several other functions, such as anti-tumor, anti-inflammatory and antimicrobial, in addition to antioxidant and its use in maintaining sperm viability has

[1] Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS.

[2] Laboratório Multiusuário de Reprodução- FAMEZ/UFMS.

[3] Docentes FAMEZ/UFMS.

been successfully adopted in several species [6]. Carnosine (β-alanyl-L-histidine), being a dipeptide naturally found in the mammalian organism, acts by eliminating the products responsible for lipid peroxidation, with greater influence on the malondialdehyde (MDA) molecule as pointed out by Drozak [7]. In turn, ozone gas (O3) has been challenged for a possible indirect antioxidant effect, in the perspective that, if used safely, its oxidizing power induces a mild oxidative stress, promoting the elevation of enzymatic antioxidants [8].

In view of the facts presented, the present experiment aimed to evaluate the addition of the Quercetin flavonoid, Carnosine or Ozone gas to the freezing diluent, aiming at reducing the cryoinjury caused to the bovine semen.

Materials and Methods – Were used five Nellore *Bos indicus* bulls, aged between 24 and 36 months, previously selected by andrological examination in accordance with the parameters established by the Manual of Andrological Examination and Animal Semen Evaluation of Brazilian College of Animal Reproduction [9]. Three collections were carried out per bull (n = 15) by electroejaculation. Immediately after collection, ejaculate volume (mL), sperm concentration (x10^6 sperm/mL), motility (%) and vigor (1-5; [9]) were measured. Ejaculates that presented minimum 80% of motile sperm and vigor 3 were used in this experiment. For freezing commercial diluent Botu-Bov™ (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brazil) was used.

Each ejaculate was distributed in 10 experimental groups, namely: group C (CONTROL - without addition of treatments), group O15 (15 µg/mL of ozone), group O30 (30 µg/mL of ozone), group O60 (60 µg/mL of ozone), group Q25 (25 µg/mL of quercetin), group Q50 (50 µg/mL of quercetin), group Q100 (100 µg/mL of quercetin), group CAR100 (100 ng/mL of carnosine), group CAR200 (200 ng/mL of carnosine) and group CAR300 (300 ng/mL of carnosine) and subjected to the conventional cryopreservation process [10]. The semen was thawed in water bath at 37 ºC for 30 seconds. The analyzes were performed immediately after thawing (M0) and after incubation at 46º C for 30 minutes (Rapid Thermoresistance Test - RTT; M30; [11].

Sperm kinetics analyzes were performed using a computerized system (SCA™ - Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Spain). The variables used were total motility (TM; %), progressive motility (PM; %), curvilinear speed (VCL; µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH; µm) and linearity (LIN; %), pointed out as those that best correspond to the degree of sperm hyperactivation in a semen sample [12], [13].

Plasma membrane integrity, acrosome integrity, plasma membrane fluidity, mitochondrial activity and susceptibility to lipoperoxidation were performed via flow cytometry. Spermatozoa were classified into: intact plasma membrane with intact acrosome (PIPNA; %), intact and non- fluid plasma membrane (YOMERO; %), intact plasma membrane and high mitochondrial potential (PIMST; %) and percentage of peroxidized cells (PERO; %).

The free software R™ was used to perform the statistical analyzes. The analyzes were based on answering the following questions: For each variable analyzed, is there a statistical

difference between treatments at time zero and time 30? And if so, where is the difference? To compare the effects of the treatment groups on the variables analyzed, the means were assessed by the Kruskal-Wallis non-parametric test, considering 5% significance and in case of significance, the Dunn test was performed as a post-hoc test.

Results and Discussion - Quercetin and Carnosine did not promote evidence of hyperactivation in the samples. Such results lead us to believe that the antioxidants in question probably have an important action on the maintenance of sperm kinetic patterns, and their use in situations that offer greater challenges may be interesting.

The results for PM and TM at moments 0 and 30 did not show any significant difference between the treatments with quercetin, carnosine and the control group ($p > 0.05$), but they showed differences of all these when compared to the treatments with ozone ($p < 0.01$), being lower the values resulting from ozone treatments. Ozone reduced the values for the same variables in both M0 and M30, showing that in these concentrations its oxidizing power [14]. Our experiment found similarities between Control, Quercetin and Carnosine treatments with respect to variables VCL, LIN and ALH ($p > 0.05$).

For the results of PIPNA_0 and PIMST_0 there were no significant differences between treatments ($p > 0.05$). However, at time 30 (PIPNA_30 and PIMST_30), ozone treatments were significantly lower than the other groups ($p < 0.01$). Although there was a slight improvement in the values of TM and PM in the quercetin and carnosine groups when compared to the control, this is not explained by a greater mitochondrial potential (PIMST; $p > 0.05$), which would make the sperm have greater motility. However, as well as not adding benefits, the addition of quercetin and carnosine was also not harmful to the cell structure.

For the variables YOMERO and PERO at moments 0 and 30, it was not possible to identify significant differences between the groups ($p > 0.05$). The results found suggest that, although sperm kinetics values were impaired with ozone supplementation, it did not completely damage the cell structure, since there was no significant difference for PIPNA (intact plasma membrane and intact acrosomal membrane), YOMERO (intact membrane and organized bilayer) and PERO (percentage of peroxidized cells). This result encourages us to think about the effect of ozone if its dosage was lower, since for kinetics the values worsened with increasing dose and for the structure there was no such damage.

Final considerations - From the exposed results, it was possible to conclude that quercetin and carnosine in the concentrations used does not promote significant gains to frozen semen, nor did it demonstrate cytotoxicity. However, it was observed that ozone in the adopted concentrations does not promote improvement in the parameters of sperm kinetics, not being observed its paradoxical effect as an antioxidant for these characteristics, however the fact that the gas did not harm the structure of the sperm cell does not prevent its use, and it is necessary to test smaller doses for this purpose.

Referências bibliográficas

[1] E. R. Andrade, M. M. Seneda, A. A. Alfieri, "Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes," *Rev. Bras. Reprodução Anim.*, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.

[2] J. E. Duque C, B. A. Rojano, and G. Restrepo B, "Criotolerancia de Semen Equino Congelado con Aditivos en el Diluyente TT - Cryotolerance of Stallion Semen Frozen with Addivites in the Extender," *Rev. Investig. Vet. del Perú*, v. 28, n. 1, p. 120–129, 2017. doi: 10.15381/rivep.v28i1.12944.

[3] M. Maia and S. Bicudo, "Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão," *Rev. Bras. Reprodução Anim.*, v. 33, n. 4, p. 183–193, 2009.

[4] D. Mortimer, "Sperm Preparation Methods," *J. Androl.*, v. 21, n. 3, p. 357–66, 2000. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb03390.x.

[5] E. C. B. Silva, J. F. P. Cajueiro, S. V. Silva, P. C. Soares, and M. M. P. Guerra, "Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm," *Theriogenology*, v. 77, n. 8, p. 1722–1726, 2012. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.11.023.

[6] D. S. dos Santos and M. M. F. Rodrigues, "Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão," *Estação Científica (UNIFAP)*, v. 7, n. 3, p. 29, 2017. doi: 10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35.

[7] J. Drozak, M. Veiga-da-Cunha, D. Vertommen, V. Stroobant, and E. Van Schaftingen, "Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1)," *J. Biol. Chem.*, v. 285, n. 13, p. 9346-9356, 2010. doi: 10.1074/jbc.M109.095505.

[8] G. E. S. Alves *et al.*, "Efeitos do ozônio nas lesões de reperfusão do jejuno em eqüinos," *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.*, v. 56, n. 4, pp. 433–437, 2004, doi: 10.1590/s0102- 09352004000400002.

[9] CBRA, *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.* 3. ed. Belo Horizonte: CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013.

[10] C. O. G. Abud, L. J. Abud, J. C. O. Neto, M. A. N. Dode, J. R. B. Sereno, and C. F. Martins, "Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino," *Cienc. Anim. Bras.*, vol. 15, no. 1, pp. 32–37, 2014, doi: 10.5216/cab.v15i1.12233.

[11] F. P. Vianna, F. O. Papa, F. S. Zahn, C. M. Melo, and J. A. Dell'Aqua, "Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen," *Anim. Reprod. Sci.*, v. 113, n. 1–4, p. 279–282, 2009. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.06.009.

[12] A. Nassar, M. Mahony, P. Blackmore, M. Morshedi, K. Ozgur, and S. Oehninger, "Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline- induced hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm," *Fertil. Steril.*, v. 69, n. 4, p. 748–754, 1998. doi: 10.1016/S0015-0282(98)00013-2.

[13] J. Verstegen, M. Iguer-Ouada, and K. Onclin, "Computer Assisted Semen Analyzers In Andrology Research and Veterinary Practice," *Theriogenology*, n. 57, p. 149–179, 2002. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00664-1.

[14] G. V. Sunnen, "Ozone in Medicine: Overview and Future Directions," *J. Adv. Med*, v. 1, n. 1, p. 159–174, 1988 [Online]. Available: http://www.triroc.com/sunnen/topics/ozonemed.htm.

Acknowledgments - This work was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - Brazil (CAPES) - Financing Code 001 ". We would also like to thank the Federal University of Mato Grosso do Sul and the Multiuse Animal Reproduction Laboratory (FAMEZ / UFMS), which provided the facilities for carrying out the experiments.

Cronologia da incidência de anomalias morfológicas espermáticas em touros búfalos (*Bubalus bubalis*) sob estresse térmico de curta duração

Arnaldo Algaranhar Gonçalves[1]
algaranhar.vet@gmail.com
Alexandre Rossetto Garcia[2]
Gabriela Santos da Cruz[1]
Simone do Socorro Damasceno Santos[1]
Otávio Mitio Ohashi[1]

Abstract: The study aimed to evaluate the effect of short-term heat stress on sperm morphology, relating them to the stages of spermatogenesis. Adult buffalo bulls underwent scrotal insulation (day 0; 48 hours). Semen samples were collected every 7 days (day -7 to day 49) and analyzed. Heat stress destabilized scrotal thermoregulation (36.1±0.3 °C and 35.5±2.3 °C, after 24 and 48 hours of insulation) and returned to baseline five days after removal of the stressor stimulus (33.2±0.6°C). The sequential expression of the morphological defects showed tail defects (days 7 to 14), cytoplasmic droplets (days 14 to 28) and sperm head defects (day 28). Hyperthermia more severely damaged sperm in epididymal transit, elongated sperm and secondary spermatocytes. Thus, buffalo bulls presented a peculiar manifestation of sperm morphological defects after short-term stress, indicating an important difference regarding the bovine species. Therefore, during the andrological evaluation, allometric extrapolation between these species should be avoided.

Keywords: scrotal insulation, spermiogram; sperm defects.

Palavras-chave: espermiograma, defeitos espermáticos, insulação escrotal.

Introdução - A espermatogênese é um processo altamente coordenado por sucessivas divisões celulares e diferenciação das células germinativas [1]. Nos bubalinos, a espermatogênese dura aproximadamente 38 dias e é constituída por 4,5 ciclos do epitélio seminífero, os quais são divididos em: espermatogônias tipo A, espermatogônias intermediárias tipo B, espermatogônias tipo B, espermatócitos jovens, espermatócitos primários velhos, espermatócitos secundários, espermátides com núcleo redondo e espermátides com núcleo alongado. O tempo aproximado para formação e diferenciação das espermatogônias é de 13,9 dias, dos espermatócitos primários e secundários é de 13,5 dias, enquanto as espermátides requerem 10,6 dias [2]. Em condição de hipertermia, os espermatócitos em paquíteno e em diplóteno, e as espermátides mais jovens são os estágios celulares mais afetados em humanos [3], ratos [4] e bovinos [5]. Sabe-se que existem diferenças nos animais de produção quanto à resposta

[1] Universidade Federal do Pará.
[2] Embrapa Pecuária Sudeste.

ao estresse térmico [6], contudo há carência de informações cientificas específicas para búfalos domésticos. Por isso, o objetivo do estudo foi avaliar como o estresse térmico de curta duração induzido por insulação escrotal em touros bubalinos afeta a morfologia espermática observadas no sêmen *in natura* relacionando os achados morfológicos aos diferentes estágios do processo espermatogênico e maturação das células espermáticas.

Material e Métodos – Foram utilizados cinco touros bubalinos adultos (*Bubalus bubalis*) Murrah. As coletas de sêmen foram realizadas a cada sete dias, em duas etapas, sendo uma etapa anterior (dia -7 ao dia 0) e outra posterior (dia 2 ao dia 49) ao procedimento de insulação escrotal [7]. Os touros receberam a bolsa insuladora no dia 0, concomitantemente, a qual foi retirada após 48 horas de insulação escrotal e o estresse calórico desestabilizou a termorregulação escrotal. A temperatura da superfície escrotal foi controlada por termometria digital durante todo o período de insulação, sendo registrado valores médios de 32,1 ± 0,2 °C (imediatamente antes da insulação), e de 36,1 ± 0,3 °C e 35,5 ± 2,3 °C, 24 horas e 48 horas após a manutenção da bolsa insuladora, respectivamente. As células espermáticas foram avaliadas individualmente em microscopia de contraste de fase (1000X) quanto à morfologia. Cada defeito foi avaliado, e as células categorizadas como portadoras de: defeito de cabeça, peça intermediária e cauda [8]. As gotas citoplasmáticas foram classificadas em proximal e distal, dependendo de sua posição na célula [9]. As variáveis de resposta foram analisadas por ANOVA, adotando uma análise longitudinal com medidas repetidas no tempo. A comparação das médias foi realizada pelo Teste de Duncan, com nível de significância P≤0,05.

Resultados e Discussão - O estresse térmico teve efeito negativo sobre a morfologia espermática (Figura 1). Houve aumento significativo na incidência dos defeitos de cauda (P<0,05) logo após sete dias do desafio térmico, comprovando que a hipertermia escrotal causa efeitos deletérios nos espermatozoides que se encontravam em processo de maturação epididimária [10]. Essa manifestação se manteve prevalente até o 14º dia após o estresse térmico escrotal (P<0,05), demostrando que o incremento térmico não fisiológico pode causar desalinhamento da bainha mitocondrial ou fraturas axonemais nos espermatozoides [11].

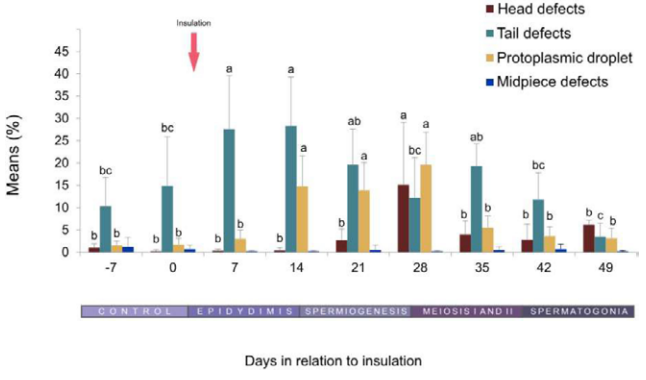


Figura 1. Média (± desvio padrão) dos defeitos morfológicos espermáticos de cabeça, peça intermediária, cauda e gotas citoplasmáticas em sêmen de búfalos, após estresse térmico escrotal induzido (seta verme-

lha). Indicação nos dias de coleta de sêmen correspondentes às etapas espermatogênicas antes (controle) e após a insulação escrotal (epidídimo, espermiogênese, meiose I e II e espermatogônia). Valores dentro da mesma categoria de defeito com sobrescritos distintos diferem significativamente (P<0,05).

A segunda mudança expressiva na manifestação de defeitos morfológicos espermáticos foi a ocorrência de gotas citoplasmáticas aderidas à peça intermediária. Esse tipo de defeito indica que houve dano às espermátides e aos espermatócitos secundários, uma vez que sua manifestação ocorreu entre 14 e 28 dias após o estresse calórico, respectivamente. A migração das gotas citoplasmáticas também está relacionada ao ambiente epididimário e, quando há falhas durante a espermatogênese, os espermatozoides tornam-se menos responsivos à maturação que deveria ocorrer no epidídimo [12]. A última categoria de anormalidades a se manifestar de maneira relevante foram os defeitos de cabeça. Essas anormalidades foram derivadas da ação da hipertermia no momento em que os espermatócitos se encontravam em fase de meiose II ou quando as espermatogônias estavam em processo de divisão mitótica, ainda na camada basal dos túbulos seminíferos. Dentre as anomalias detectadas na cabeça do espermatozoide, prevaleceram os defeitos de acrossoma. Isso se deu possivelmente devido à interrupção na biogênese acrossomal durante a meiose dos espermatócitos e que pode estar relacionados a prejuízos às enzimas modificantes das histonas, como as histonas metiltransferases, que participam na atividade de transcrição para formação do acrossoma [13].

Considerações Finais – O estresse térmico escrotal de curta duração teve efeitos deletérios na morfologia espermática, e a hipertermia prejudicou as células da linhagem germinativa, em diferentes estágios de divisão e diferenciação celular. As células germinativas mais sensíveis à hipertermia de curta duração foram os espermatozoides em maturação epididimária, as espermátides alongadas e os espermatócitos primários. Essa característica fez com que a cronologia de expressão das anomalias morfológicas espermáticas fosse peculiar nos touros bubalinos, com manifestações de defeitos morfológicos de cauda, gota citoplasmática e de cabeça espermática, nesta sequência. Em função da diferença relativa à espécie bovina, sugere-se que atenção seja dada durante a avaliação andrológica dos touros bubalinos, de modo a evitar extrapolação alométrica ou comparações diretas entre essas espécies.

Referências bibliográficas

[1] NISHIMURA, H; HERNAULT, S. W. L. Spermatogenesis. *Curr. Biol.*, v. 27, p. 979-1001, 2017.

[2] SHARMA, A. K; GRUPTA, R. C. Duration of seminiferous epithelial cycle in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.*, v. 3, p. 217-224, 1980.

[3] CARLSEN, E; ANDERSSON, A. M; PETERSEN, J. H; SKAKKEBAEK, N. E. History of febrile illness and variation in semen quality. Hum. Reprod., v.18, p.2089-2092, 2003.

[4] LUE, Y. H; HIKIM, A. P; SWERDLOFF, R. S; IM, P; *et al*. Single exposure to heat induces stages-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*,. v. 140, p. 1709-1717, 1999.

[5] RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D. *et al.* Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue Bulls. *Theriogenology*., v. 76, p. 1246-1257, 2011.

[6] KAHWAGE, P. R.; ESTEVES, S. N.; JACINTO, M. A. C; BARIONI JUNIOR, W. *et al*. Higth systemic and testicular thermolytic efficiency during heat tolerance test reflects better semen quality in rams of tropical breeds. *Int. J. Biometeorol*., v. 61, n. 10, p. 1819-1829, 2017.

[7] GONÇALVES, A. A; GARCIA, A. R; ROLIM FILHO, S. T; DA SILVA, J. A. R; *et al*. Scrotal thermoregulation and sequential sperm abnormalities in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) under short-term heat stress. *J. Thermal. Biol*., v. 96, 2021.

[8] BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 1.ed. Ames: Iowa State University Press; 1989.

[9] GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A; HERNÁNDEZ-CARAVACA, I; MATÁS, C; SORIANO-ÚBEDA, C; ABRIL-SÁNCHEZ, S. *et al*. Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *J. Reprod. Develop*., v. 61, p. 407-413, 2015.

[10] HAMILTON, T. R; MENDES, C. M; DE CASTRO, L. S; DE ASSIS, P. M. *et al*. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. *Oxid Med Cell Longev*., 2016:1687657.

[11] LUÑO, V; MARTÍNEZ, F; BOROBIA, M; H¨ORNDLER, C; GIL, L. Sperm tail defects and abnormal testicular blood flow in a Beagle dog: a case report. *Top. Companion Anim. Med*., v. 38, p. 1-4, 2020.

[12] COOPER, T. G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian. J. Androl*., v. 13, p. 130-138, 2011.

[13] ZUO, X.; RONG, B.; LI, L.; LV, R. The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and essential for spermiogenesis in mice. *J. Biol. Chem*., v. 293, n. 24, p. 9188-9197, 2018.

Agradecimentos: À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela concessão de bolsa de estudos a AAG. ARG é bolsista de produtividade do CNPq.

Avaliação da morfometria testicular e dos parâmetros do ejaculado de caprinos da raça Boer

Rafaeli Fagá Daniel[1]
Carla Fredrichsen Moya[1]
carlafredrichsen@yahoo.com.br

Abstract: The present study aimed an andrological examination and the seminal parameters of Boer goats as part of the activities in the scientific research. The activities were performed at the Guarapuava - PR and towns around, from October to December 2020. Nine goats of Boer breed were used to get information, first an anamnesis evaluation of these individuals was performed, then clinical examination and next an andrological evaluation seeking to analyze the testicle's parameters how scrotal circumference, length, width and thickness, also sperm's parameter such as volume, mass movement, motility, vigor, spermatic concentration and spermatic morphology. To evaluate the results, the animals were separated into three groups according to their ages, so G1 (< 2 years old), G2 (= 2 years old) and G3 (> 2 years old). Observing the results, it was evident that some parameters have some changes with the age, like length of testicle and spermatic concentration.

Keywords: andrology, semen, goat.

Palavras-chave: andrologia, sêmen, caprino.

Introdução - No Brasil, a caprinocultura encontra-se disseminada por todos os estados, sendo para a produção de carne, leite, couro e/ou lã, trazendo significativo retorno financeiro para os envolvidos no sistema [1]. Um dos fatores que vêm auxiliando este desenvolvimento, é o avanço das biotecnologias de reprodução para a espécie, que visam otimizar o material genético disponível dos rebanhos [2].

Os bodes possuem algumas características anatomofisiológicas reprodutivas, que os diferenciam das demais espécies domésticas. Os testículos, que são em número de dois, simétricos, de forma ovóide e, situam-se verticalmente na túnica vaginal do escroto, sendo que, seu tamanho e peso variam conforme a raça, estação do ano, condição nutricional e fatores individuais e, estão relacionados diretamente com a capacidade de produção espermática [3], vale ressaltar que esses atingem sua maturidade anatômica próximo aos 150 dias de vida do animal [4]. De forma resumida, os caprinos apresentam três características marcantes, sendo a estacionalidade reprodutiva (poliéstricos estacionais de dias curtos), boa prolificidade e o período de gestação curto [5]. No que se refere ao ejaculado caprino, as diferenças estão relacionadas às atividades das glândulas bulbo uretrais, como a síntese e secreção de enzimas com atividade fosfolipase liberadas no plasma seminal e, a produção da fração proteica denominada SBUIII, que hidrolisa triglicerídeos [6].

[1] Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

A fim de consolidar e fortalecer essa cadeia, que tende a crescer cada vez mais, as instituições públicas têm auxiliado os envolvidos, disponibilizando recursos, resultados de pesquisa e incentivos [1]. Logo, pensando no atual cenário da caprinocultura e da necessidade de conhecer melhor as particularidades da espécie caprina e da raça Boer, foi desenvolvido este trabalho, visando auxiliar os caprinocultores a atingir melhores resultados na produção, por meio de padronização da morfometria testicular e qualidade espermática de bodes da raça Boer, da cidade de Guarapuava - PR e região.

Material e Métodos - Foram selecionados nove bodes hígidos da raça Boer, com idade entre um ano e meio e três anos, apresentando escore de condição corporal entre 2,5 e 3,5 (1 a 5), pertencentes a propriedades rurais localizadas na cidade de Guarapuava - PR e região. Os dados foram colhidos entre os meses de outubro e dezembro.

Todos estes animais passaram pela anamnese, seguido do exame físico e a avaliação andrológica, que era realizada por meio da inspeção e palpação dos órgãos genitais externos, verificando as dimensões do escroto com o auxílio de um paquímetro e fita métrica (circunferência escrotal, comprimento, largura e espessura), consistência, simetria, mobilidade, temperatura e presença de lesões, além de comparar os dados com o desenvolvimento corporal e a idade do animal [7]. Para melhor avaliação dos dados, os reprodutores foram divididos em três grupos com relação a idade fornecida pelo proprietário, sendo o G1 (n=3) constituído por animais abaixo dos dois anos de idade, o G2 (n=4) por bodes com dois anos e, o G3 (n=2) pelos animais com idade acima de dois anos.

A colheita de sêmen foi efetuada com o auxílio do eletroejaculador, sendo que foi colhida apenas uma amostra por reprodutor. Após as colheitas, as amostras obtidas foram utilizadas para avaliar turbilhonamento, motilidade, vigor, concentração espermática ($x10^9$sptz/mL) e características morfológicas, além dos parâmetros macroscópicos (aspecto, volume e cor).

A morfologia espermática, foi avaliada em esfregaço de sêmen fresco diluído com uma gota de solução fisiológica, corada pela técnica de Panótico Simplificado, sob microscópio óptico, selecionando aleatoriamente 200 espermatozoides. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância, seguida pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

Resultados e Discussão - Dentre os órgãos que constituem o aparelho reprodutor masculino, os testículos encontram-se entre os principais, pois deles dependem a espermatogênese e a produção hormonal [8]. Logo, existe uma forte correspondência entre as medidas escroto-testiculares e o desenvolvimento ponderal do reprodutor, que quando associado a idade e histórico do animal, fornecem subsídios para a escolha dos indivíduos que serão destinados à reprodução no plantel [9]. Além da estacionalidade reprodutiva que pode ser influenciada pelo fotoperíodo, nutrição e efeitos sociais, que também devem ser levados em consideração na avaliação do animal [10], porém, as raças que são nativas e nativisadas no Brasil, como é o caso dos caprinos Boer, não sofrem alteração da atividade reprodutiva durante a estação do ano, mesmo em áreas próximas aos trópicos [5], logo, os dados desse estudo foram colhidos durante os meses de outubro a dezembro, uma vez que a raça em questão não sofre ação da estacionalidade.

Com relação à circunferência escrotal (CE), há estudos que apresentam o valor normal entre 28 e 36 cm e, que reprodutores com estes índices apresentam satisfatória produção espermática, enquanto que, CE muito baixa pode ser indicativa de degeneração testicular ou hipoplasia, uni ou bilateral [1] porém, não correlacionam este parâmetro com a idade do animal e com a raça. Nesse trabalho, apenas animais do G1 (< 2 anos) apresentaram circunferência escrotal de 27,3±1,53 cm, abaixo de 28 cm, enquanto G2 teve média de 31,1±1,03 e G3 de 29,5±2,12 cm (p>0,05), dentro do padrão estabelecido para a espécie [1].

Quanto aos valores de comprimento, largura e espessura dos testículos de caprinos, não há relatos específicos da raça Boer, mas de forma geral, o comprimento varia entre 5 e 9 cm, a largura e a espessura, entre 3 e 7 cm [1]. Observando os resultados da tabela 1, pode-se identificar que há um aumento crescente do comprimento testicular com relação a idade dos animais, apesar de não haver diferença significativa (p>0,05), contudo isso não ocorreu com a largura e espessura. Os três grupos apresentaram média dentro do descrito para a espécie, em relação a comprimento, largura e espessura. Todos os bodes deste estudo apresentavam simetria testicular, mobilidade normal, ausência de sensibilidade dolorosa e consistência fibroelástica dos testículos, que se encontravam em posição vertical.

Tabela 1. Média e desvio padrão da morfometria testicular

Grupo	Testículo Esquerdo			Testículo Direito		
	comprimento	largura	espessura	comprimento	largura	espessura
G1	8,57±0,99[a]	5,03±0,25[a]	4,97±0,95[a]	8,43±1,04[a]	5,00±0,61[a]	4,97±0,76[a]
G2	8,80±0,68[a]	5,78±1,04[a]	5,30±0,26[a]	8,80±0,91[a]	5,90±0,93[a]	5,80±0,14[a]
G3	9,55±0,35[a]	5,75±0,49[a]	5,20±1,70[a]	9,55±0,49[a]	5,20±0,28[a]	5,30±1,27[a]

Tukey (p>0,05).

Na tabela 2, pode-se observar que o número total de espermatozoides aumenta gradativamente em relação aos grupos, ou seja, conforme a idade aumenta, acompanhando o aumento do comprimento testicular, apesar de não haver diferença significativa (p>0,05). Apenas o G3 apresentou concentração espermática dentro do padrão estabelecido para caprinos [11]. Enquanto que, os defeitos maiores apresentam valores decrescentes do G1 em relação ao G2 e G3, e os defeitos menores aumentam gradativamente, contudo dentro dos padrões estabelecidos para a espécie [11]. Há um estudo que descreve valores diferentes aos encontrados nesta pesquisa, como: $1{,}0\pm0{,}6x10^9$ a $2{,}1\pm0{,}7x10^9$ (espermatozoides totais), 1,7±1,6 a 3,1±1,1 (turbilhonamento), de 35,4% a 64,1% (motilidade), 2,0±1,6 a 3,0±1,5 (vigor), 4,2% a 16,9% (defeitos maiores) e, 3,2% a 17,5% (defeitos menores) [1] porém, estes parâmetros foram estabelecidos utilizando a vagina artificial como método de colheita de sêmen, o que justifica a diferença dos valores obtidos entre os trabalhos, como a concentração espermática, que tende a ser menor quando se utiliza a eletroejaculação para a colheita da amostra, decorrente da maior contribuição do plasma seminal das glândulas anexas, que resulta num maior volume do ejaculado e, consequentemente menor concentração [12]. De forma geral, não especificando raça, são recomendados valores como: 80 a 90% (motilidade), 3 a $4x10^9$ (espermatozoides totais), <10% (defeitos maiores) e, <20% (defeitos menores), para utilizar o macho como reprodutor [11].

Tabela 2. Média e desvio padrão dos parâmetros analisados nos ejaculados

Grupo	Concentração total (x10⁹)	Turbilhonamento	Motilidade (%)	Vigor	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Menores (%)
G1	0,32±0,24[a]	3,00±1,00[a]	80,0±0,00[a]	3,67±0,58[a]	1,33±0,76[a]	6,33±1,61[a]
G2	1,34±0,22[a]	3,00±0,96[a]	75,0±5,77[a]	3,50±0,58[a]	0,88±1,18[a]	7,88±7,75[a]
G3	3,8±0,49[a]	3,50±0,71[a]	77,5±10,6[a]	3,50±0,71[a]	0,50±0,71[a]	12,25±10,96[a]

Tukey (p>0,05).

Considerações finais - Os parâmetros morfométricos sofrem alterações com o avanço da idade do reprodutor, em destaque, o comprimento testicular, que tende a aumentar gradativamente, assim como, a concentração espermática total do ejaculado. Os defeitos menores também apresentaram elevação em relação aos grupos de estudo, e os demais parâmetros analisados permaneceram sem alterações relevantes em relação os grupos analisados. Novos estudos, durante meses de outono e inverno deverão ser realizados para padronização dos parâmetros analisados.

Referências bibliográficas

[1] Quadros, D. G.; Cruz J. *Produção de ovinos e caprinos de corte*. Salvador: EDUNEB. 2017; 297p.

[2] Freitas, V.; Melo, L.; Teixeira, D.; Junior, E.; Nogueira, D. Biotécnicas aplicadas à reprodução de caprinos. In: Selaive-Villarroel, A. B.; Guimaraes, V. P. (Ed.). *Produção de caprinos no Brasil*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 263-280.

[3] Neves, J. P.; Nunes, J. F.; Moraes, J. C. F.; Souza, C. J. H.; Salgueiro, C. C. M.; Almeida, J. L. Inseminação artificial em pequenos ruminantes. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo J. R.; Freitas, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 83-100.

[4] Nunes, J. F. *Fisiologia sexual do macho caprino*. Sobral: Embrapa Caprinos, 1982.

[5] Fonseca, J. F. *Otimização da eficiência reprodutiva em caprinos e ovinos*. Sobral: Embrapa Caprinos, 2006.

[6] Bezerra, F. S. B. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Veterinaria Brasílica*, 2010; 4:S20-S25.

[7] Paula, N. R. O.; Andrioli, A.; Cardoso, J. F. S.; Santos, D. O.; Eloy, A. M. X. *Reprodução no macho caprino*: análise básica e aplicada. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2008.

[8] Campos, A. C. N.; Nunes, J. F.; Filho, A. H. S. S.; Monteiro, A. W. U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semiárido nordestino durante o período seco e chuvoso. B*razilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 2003; 40:185-189.

[9] Santos, D. O.; Simplício, A. A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2000; 35(9):1835-1841.

[10] Ricarte, A. R.; Silva, A. R. Morfofisiologia da reprodução de caprinos: revisão. *Acta Veterinária Brasilica*, 2010; 4:S8-S13.

[11] Bezerra, F. Q. G. Avaliação de parâmetros fisiológicos e andrológicos de caprinos jovens da raça Boer. *Medicina Veterinária*, 2007; 1:99-100.

[12] Câmara, T. S.; Neto, M. F. V.; Carvalho, M. A. M.; Nunes, J. F. Factors involved in the cryopreservation of goat semen. *Ciência Animal*, 2017; 64-79.

Relação entre volume da cauda do epidídimo e parâmetros seminais

Luis Alfredo Garcia-Deragon[1]
Neimar Correa Severo[1]
Solange Martins Almeida[1]
João Pedro Zandonaide[1]
Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro Jr[1]

Abstract: The epididymis has important functions that influence the quality of semen produced, but there are no specific citations about its influence on the quantity produced. The study and understanding of these functions is of great relevance for the evaluation of the epididymis, being essential this knowledge for the correct andrological examination. The analysis of 5,378 ejaculates from 32 Nellore bulls that had tails of the epididymis visibly detached and not detached, allowed to conclude that the bulls that had detached tails produce more sperm per ejaculate, estimating this superiority in approximately 20%, which is very important in natural breeding and in the production of frozen semen.

Keywords: epididymis tail, sperm production, andrologic evaluation.

Palavras-chave: cauda epidídimo, produção espermatozoide, avaliação andrológica.

Introdução - O Brasil possui aproximadamente 80 milhões de fêmeas em idade reprodutiva, das quais estima- se que 14% são inseminadas; as restantes são expostas a monta natural que demanda grande quantidade de touros com alta qualidade seminal. Atualmente, estima-se que aproximadamente 90 a 95% das inseminações são feitas por IATF [1]. Estes dados revelam a importância de estudos científicos para selecionar touros com o maior potencial genético para produção de sêmen. Na literatura existem muito trabalhos relacionando o tamanho dos testículos com a produção de sêmen [2,3] inclusive de longa data [4], assim como com o formato do testículo [5]. Os manuais de avaliação de touros dão relevância ao exame clínico do epidídimo [6,7] ou breve descrição do exame do epidídimo [8]. A primeira edição do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal sobre "Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal" publicado em 1992, faz descrição detalhada das características da cauda do epidídimo De acordo com o manual, "para facilitar o julgamento atribuir valores" de uma escala de 0 a 3, sendo 0 para ausência da cauda, 1 para cauda pequena e vazia, 2 para cauda de tamanho médio ou difusa, com consistência algo flácida e 3 para cauda bem delineada, simétrica em relação a adjacente, elástica, cheia e densa [9]. O epidídimo tem aproximadamente 40 metros de comprimento e desempenha diversas funções importantes, ademais, o epidídimo é responsável pelo transporte dos espermatozoides desde

[1] Alta Genetics do Brasil Ltda.

o testículo até os ductos deferentes, através de contrações localizadas do músculo liso da parede do epidídimo. O tempo de passagem dos espermatozóides pelo epidídimo é de aproximadamente 8-11 dias. O trânsito através dos ductos eferentes e do epidídimo é associado com significantes mudanças maturacionais, isto inclui, adquirir a capacidade de motilidade, condensação final do núcleo e modificação da forma do acrossoma, ligações da estrutura das proteínas por laços de dissulfeto, alteração da natureza da superfície da membrana plasmática, migração da gota citoplasmática proximal para a parte distal da peça intermediaria, ligeira deficiência de oxigênio para inibir o metabolismo, reabsorção, fagocitose e liquefação de espermatozoides defeituosos, e absorção do liquido dos túbulos seminíferos e "rete testis", desta forma concentrando os espermatozoides [10]. Espermatozoides colhidos dos ductos eferentes e da cabeça do epidídimo não tem capacidade de fecundar o gameta feminino; contudo, quando coletados do corpo ou da cauda do epidídimo, os espermatozoides já apresentam habilidade de fecundar o oócito [11]. A cauda do epidídimo tem propriedades que permitem estocar os espermatozoides por várias semanas. Uma propriedade que permite a viabilidade dos espermatozoides é a constante temperatura abaixo da temperatura corporal, em aproximadamente 5°C. Até o presente momento não existem na literatura estudos relacionando o volume ds cauda do epidídimo e quantidade de espermatozoides no ejaculado coletado por vagina artificial, pelo que entendemos torna este trabalho inédito. Os objetivos deste estudo foram avaliar a relação entre o tamanho da cauda do epidídimo e os parâmetros seminais de touros Nelore, assim como avaliar a correlação entre parâmetros seminais e a diferença esperada da progênie (DEP) para perímetro escrotal aos 365 dias.

Material e métodos - Para a análise foram incluídos no estudo 32 touros da raça Nelore de um centro de produção de sêmen, localizado no município de Uberaba, estado de Minas Gerais, Brasil, com idade variando entre 25 e 67 meses, com dieta balanceada para atender as exigências nutricionais e água *ad libitum*. Foram analisados 5.378 ejaculados, dos 32 touros, sendo 19 touros com cauda do epidídimo destacada (Grupo CED) e 13 touros com cauda do epidídimo não destacada (Grupo CEND), coletados por vagina artificial durante o período de abril de 2014 a fevereiro de 2019. A frequência de coleta dos touros utilizado no estudo foi de 2 saltos por semana, durante o período analisado. O sêmen foi envasado automaticamente (envasadora IMV MX-4™) em palheta fina (0.25 ml) e congelado no equipamento IMV Digitcool™ seguindo curva padrão de frio. Os parâmetros avaliados foram a concentração espermática por ejaculado, através de fotômetro (Accucel IMV™), perímetro escrotal através da medição do maior diâmetro da bolsa escrotal com fita métrica e DEP365 através dos dados apresentados pelo programa oficial de avaliação genética da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ). O controle de qualidade do sêmen congelado foi realizado pela análise da motilidade do sêmen em microscópio com contraste de fase e pela análise de viabilidade espermática através da Citometria de Fluxo. Essas análises geraram as informações do "% de coletas congeladas liberadas" para este estudo. O valor mínimo exigido para liberação da amostra foi de 40% de espermatozoides moveis e 35% de membranas integras após o descongelamento da palheta (37°C/30"). A análise estatística dos dados contínuos e binomiais foi realizada através do Procedimentos GLIMMIX do SAS 9.4. A analise de correlação foi

realizada através do método de Pearson usando o Procedimento CORR do SAS. O nível de significância adotada no estudo foi P ≤ 0.05.

Resultados e Discussão - A quantidade de espermatozoides por ejaculado foi 13,4 e 10,7 bilhões (P = 0,05), a média do PE foi 43,2 e 43,0 cm (P = 0,75) e a DEP para PE aos 365 dias foi 0,95 e 1,14 (P = 0,33), para o grupo de caudas destacadas (CED) e não destacadas (CEND), respectivamente. O grupo CED apresentou maior quantidade de espermatozóides por ejaculado que o grupo CEND (Tabela 1). No entanto, para o PE, a DPE365, o número médio de coletas e o percentual de ejaculados aprovados e congelados não diferiram entre CED e CEND (Tabela 1). Na análise de correlação, foi observado uma correlação positiva entre a idade e quantidade de espermatozoides no ejaculado (R = 0.45, P = 0,01), entre PE e quantidade de espermatozoides no ejaculado (R = 0,43; P = 0,01), entre quantidade de espermatozoides no ejaculado e percentagem de coletas liberadas (PerColLib; R = 0,41; P = 0,02), e entre quantidade de espermatozoides no ejaculado e a percentagem de coletas congeladas liberadas (PerColConLib; R = 0,35; P = 0,05), respectivamente.

A média de espermatozoides produzidos por ejaculado (12.31 bilhões) foi semelhante a encontrada por Brito *et al* 2002 para Bos indicus [12]. A quantidade de sêmen produzido tem sido relacionada há longa data com a circunferência escrotal [3,13] e inclusive com a forma dos testículos, sendo a forma arredondada a que produz menos espermatozoides comparada com as formas alongada e elíptica [5]. Estes estudos não fazem referência à avaliação do tamanho da cauda do epidídimo como uma possível influencia na produção de espermatozoides e que potencialmente estão disponíveis durante a coleta do sêmen. No presente trabalho foi encontrada relação do tamanho da cauda do epidídimo e a quantidade de espermatozoides coletados; contudo não foi observada relação do tamanho da cauda do epidídimo e a qualidade espermática, expressa pela percentagem de coletas aprovadas para o congelamento e a taxa de congelamento (PerColLib e PerColConLib). O manual da sociedade americana de andrologia [7] cita de forma genérica um efeito das caudas dos epididimos sobre a quantidade e qualidade do semen que varia de "nenhum efeito perceptível à baixa qualidade do sêmen e oligospermia".

Tabela 1 – Perímetro escrotal, diferença esperada da progênie em relação do perímetro escrotalaos 365 dias de idade (DEP365), quantidade de coletas realizadas, quantidade de espermatozoides no ejaculado, e a percentagem de ejaculados aprovados para congelação e após a congelação de acordo com o volume da cauda do epidídimo.

	Destacadas	Não destacadas	Valor de *P*
Perímetro escrotal (cm)	43.2 ± 0.34	43.0 ± 0.41	0.75
DEP365 (cm)	0.95 ± 0.12	1.14 ± 0.15	0.33
Número médio de coletas	201.1± 41.1	135.0 ± 49.8	0.32
Espermatozoides/ejaculado (10x9)	13.4 ± 0.82	10.7 ± 1.0	0.05
Coletas liberadas (%)	77.6 ± 9.5	62.3 ± 13.6	0.36
Coletas congelados liberadas (%)	96.2 ± 4.4	91.5 ± 7.8	0.59

Conclusões - Baseados nos resultados podemos considerar que o tamanho da cauda do epidídimo tem relação com a produção de espermatozoides por ejaculado, mas não tem relação com o PE, DEP365 e qualidade do sêmen representada pelas características PerColLib e PerColConLib. Os touros com cauda do epidídimo destacada têm um potencial de produzirem aproximadamente 20% a mais de espermatozoides por ejaculado quando coletados frequentemente com vagina artificial. Esse fato se deve a maior capacidade de armazenamento da cauda do epidídimo destacada. Devido à importância comprovada devemos dar uma atenção especial a avaliação da cauda do epidídimo durante o exame andrológico.

Referências Bibliográficas

[1] Baruselli, P. S. IATF gera ganhos que superam R$ 3,0 bilhões nas cadeias de carne e de leite. *Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal*/FMVZ/USP, 2. ed., 2019. Acesso http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/. Acesso em: 04 jun. 2019.

[2] Almquist, J. O.; Branas, R. J.; Barker, K. A. Postpuberal changes in semen production of Charolais bulls ejaculated at high frequency and the relation between testicular measurements and sperm output. *J Anim. Sci* 1976; 42:670-6.

[3] Coulter, G. H.; Keller, D. G. Scrotal circumference of young beef bulls: relationship to paired testes weight, effect of breed, and predictability. *Canadian Jour. of Anim. Sci.* 1982; 62:133-9.

[4] Willet, E.; Ohms, J. Measurement of testicular size and its relation to production of spermatozoa by bulls. *J Dairy Sci.* 1957; 40:1559-69.

[5] Bailey, T. L.; Monke, D. R.; Hudason, R. S.; Wolfe, D. F.; Carson, R. L.; Riddell, G. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. *Theriogenology*, v. 46, p. 881-887, 1996.

[6] Barth, A. D. *Bull Breeding Soundness*. 3ed. Western Canadian Association of Bovine Practitioners. 2013

[7] Koziol, J. H.; Armstrong, C. L. *Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls*. 2. ed. American Society for Theriogenology, 2018.

[8] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

[9] Fonseca, V. O.; Vale Filho, V. R.; Mies Filho, A.; Abreu, J. J. *Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal*. CBRA, 1992.

[10] Barth, A. D., OKO, R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

[11] Orgebin-Crist, M. E. Studies on the function of the epididymis. *Biol. Reprod.* [Suppul.]1:155- 175, 1969.

[12] Brito, L. F. C.; Silva, A. E. D. F.; Rodrigues, C.; Vieira, F. V.; Garcia-Deragon, L. A.; Kastelic, F. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in Bos indicus and Bos taurus AI bulls in Brazil. *An. Reprod. Sci*. 70 (2002) 181–190.

[13] Swierstra, E. Structural composition of Shorthorn bull testes and daily spermatozoa production as determined by quantitative testicular histology. *Canadian Journal of Animal Science* 1966; 46:107-19.

Características ecográficas do parênquima testicular de touros mantidos em pastagens de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta em clima tropical

Narian Romanello[1]
Andréa do Nascimento Barreto[2]
Marco Antonio de Paula Sousa[2]
Felipe Tonato[3]
Cintia Righetti Marcondes[3]
Alexandre Rossetto Garcia[3]
alexandre.garcia@embrapa.br

Abstract: The study aimed to evaluate the effects of shaded pastures on the testicular echogenicity and scrotal circumference of bulls raised in a tropical environment. Sixty four bulls (n=64) were used in the experiment. Sixteen bulls of Nelore (*Bos indicus*) and Canchim breeds (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) were kept in shaded pastures (iLPF) or in full sun pastures (PS) during one year. Testicular parenchyma integrity was evaluated by using Mode B ultrasonography every month. The data were analyzed by ANOVA and multiple comparisons of means were performed by Fisher's adjusted test (P<0.05). The scrotal circumference increased over the seasons. The bulls presented less homogeneous testicular parenchyma in the spring. The hyperechogenicity of testicular parenchyma increased in spring, regardless of system of production or breed. Canchim bulls kept in shaded system presented lower hyperechogenicity in the spring (P<0,05).

Keywords: bovine, testicular ultrasound, iLPF.

Palavras-chave: bovinos, ultrassonografia testicular, iLPF.

Introdução – Estudos recentes que investigam estratégias de manejo no intuito de minimizar o efeito do aumento da temperatura ambiente sobre a eficiência da pecuária de corte têm se tornado cada vez mais relevantes[1] Nesse contexto, o sistema de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (iLPF) tem sido apresentado como alternativa para integração dos componentes do sistema produtivo, visando atingir patamares mais elevados de enriquecimento ambiental, bem- estar animal e qualidade do produto final[2]. Do ponto de vista global, o aumento progressivo da temperatura ambiente é preocupante, visto que nos próximos anos as mudança climáticas poderão comprometer a produção de alimentos de origem vegetal e animal[3]. Assim, a adoção de estratégias de manejo ambiental, como a inserção do componente arbóreo nos sistemas de pastagens para mitigação dos impactos de eventos extremos, concomitan-

[1] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP.
[2] Universidade Federal do Pará.
[3] Embrapa Pecuária Sudeste.

temente à seleção de animais mais adaptáveis às oscilações biometeorológicas, podem ser medidas providenciais para elevar a competitividade dos sistemas de produção pecuários. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar as características do parênquima testicular e biometria escrotal de touros bovinos das raças Nelore e Canchim mantidos em sistemas de produção de pastagens com ou sem arborização, em ambiente tropical. Com isso, pretende-se gerar ferramentas que possam contribuir para maior ambiência de touros criados em sistemas de produção a pasto e que possam impactar positivamente na sua eficiência reprodutiva.

Material e Métodos – O experimento foi conduzido na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos-SP, Brasil (21°56'23"S, 47°50'17"W, altitude 854 m), durante o ano de 2018. O tipo climático local é Cwa, tropical de altitude, conforme classificação de Köppen-Geiger, com quatro estações climáticas definidas: Verão (dezembro a março), Outono (março a junho), Inverno (junho a setembro) e Primavera (setembro a dezembro). Ao longo do ano, a temperatura máxima do ar varia de 29,2 a 36,6 °C com picos de até 38,0 °C. A média de umidade relativa do ar varia de 55,3 a 90,5%. A precipitação anual é de 1.361 mm e a média da radiação solar no Verão é de 20,85 MJ/m^2/dia. Foram utilizados 64 touros, sendo 32 Nelore (*Bos indicus*) e 32 Canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*), com 27 meses de idade e 412 kg ao início do experimento. Os animais foram alocados e mantidos durante um ano em dois sistemas de produção distintos: Sistema de pastagens convencionais a pleno sol (Grupo PS; 16 Nelore e 16 Canchim) e Sistema de iLPF com arborização (Grupo iLPF; 16 Nelore e 16 Canchim). A biometria escrotal foi aferida mensalmente com fita maleável graduada, durante procedimento de pesagem dos animais em balança eletrônica. Exame ecográfico dos testículos para avaliação do parênquima testicular direito e esquerdo foi realizado por ultrassonografia em Modo B, também mensalmente. A interpretação ultrassonográfica considerou a homogeneidade do parênquima testicular e a presença de pontos hiperecóicos[4]. As características ecográficas foram categorizadas em classes de homogeneidade (escala: 0-2) e de hiperecogenicidade (escala: 0-3). Os resultados ultrassonográficos foram apresentados como a média dos testículos contralaterais. Os dados foram submetidos à ANOVA, utilizando o procedimento MIXED do SAS, considerando no modelo os efeitos fixos principais de tratamento, estação e raça, e suas interações. As comparações múltiplas entre médias foram realizadas com o teste ajustado de Fisher ($P<0,05$).

Resultados e Discussão – O perímetro escrotal apresentou incremento ao longo das estações, com maior valor observado na Primavera (Tabela 1). Esse resultado deriva do crescimento gonadal fisiológico ao longo do tempo, em função do aumento da idade e do peso dos animais, que alcançaram em média 39 meses e 634 kg ao final do experimento. Durante os meses iniciais, os touros Canchim apresentaram maior perímetro escrotal, decorrente do formato mais globoso que seus testículos apresentam quando comparados aos dos touros Nelore, que são mais longilíneos. Ao final do estudo, a ausência de diferença no perímetro escrotal ($P>0,05$) mostra que touros Nelore tiveram aceleração no crescimento gonadal ao longo do tempo, mas este não foi significativamente influenciado pelo sistema de produção.

Tabela 1. Valores médios (± erro padrão) do perímetro escrotal (cm) e de características ultrassonográficas do parênquima testicular quanto à homogeneidade (escala: 0-2) e hiperecogenicidade (escala: 0-3) de touros Nelore e Canchim mantidos em sistema a pleno sol ou em sistema com arborização (iLPF) em ambiente tropical.

Estação	Pleno Sol		*iLPF*	
	Nelore (n=16)	Canchim (n=16)	Nelore (n=16)	Canchim (n=16)
	Perímetro Escrotal (cm)			
Verão	31,3±0,49^{bD}	33,3±0,49^{aD}	31,5±0,49^{bD}	34,2±0,49^{aC}
Outono	33,3±0,50^{C}	34,4±0,50^{C}	33,4±0,50^{bC}	34,9±0,50^{aB}
Inverno	34,5±0,50^{B}	35,9±0,50^{B}	34,9±0,50^{B}	36,2±0,50^{A}
Primavera	35,7±0,50^{A}	36,6±0,50A	35,5±0,51^{A}	36,5±0,51^{A}
	Homogeneidade (0-2)			
Verão	0,1±0,05^{C}	0,2±0,05^{C}	0,1±0,05^{B}	0,1±0,05^{B}
Outono	0,2±0,06^{bC}	0,4±0,06^{aB*}	0,2±0,06^{B}	0,1±0,06^{B}
Inverno	0,7±0,06^{bB}	0,9±0,06^{aA}	0,9±0,06^{A*}	0,8±0,06^{A}
Primavera	0,9±0,06^{A}	1,0±0,06^{A}	0,9±0,07^{A}	0,9±0,07^{A}
	Hiperecogenicidade (0-3)			
Verão	0,3±0,14^{bD}	0,7±0,14^{aD}	0,5±0,14^{B}	0,4±0,14^{C}
Outono	0,6±0,15^{C}	1,0±0,15^{C}	0,7±0,15^{B}	0,8±0,15^{B}
Inverno	1,0±0,15^{bB}	1,8±0,15^{aB}	1,4±0,15^{A}	1,6±0,15^{A}
Primavera	1,6±0,15^{bA}	2,3±0,15^{aA*}	1,5±0,16^{A}	1,5±0,16^{A}

^{a,b} Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem significativamente entre genótipos dentro do mesmo sistema (P<0,05). ^{A,B,C} Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma coluna diferem significativamente entre as estações dentro do mesmo sistema.(P<0,05). (*) Médias seguidas de asterisco na mesma linha diferem significativamente entre sistemas dentro do mesmo genótipo. (P<0,05).

A homogeneidade do parênquima testicular apresentou incremento ao longo do tempo, com maiores valores na Primavera para ambos os genótipos, independentemente do sistema de produção. No inverno, animais Nelore mantidos em sistema arborizado apresentaram parênquima testicular mais homogêneo, quando comparados aos animais da mesma raça mantidos a pleno sol. Contudo, efeito inverso foi observado para touros Canchim, no outono. Quando mantidos em pastagens não dotadas de sombreamento, touros Canchim apresentaram maior hiperecogenicidade do parênquima testicular que os touros Nelore. Na Primavera, menores valores de hiperecogenicidade de parênquima foram observados nos animais Canchim mantidos no sistema arborizado, quando comparados aos seus contrapartes criados a pleno sol.

Como os pontos hiperecoicos indicam regiões de micromineralização dos túbulos seminíferos, a presença de sombreamento nas pastagens pode representar um elemento de proteção ambiental adicional aos touros compostos, quando considerado o efeito cumulativo do desconforto térmico ao longo de sua vida reprodutiva. A análise da ecogenicidade do parênquima testicular de touros em Modo B é importante porque as avaliações biométricas de escroto e testículos, mesmo quando realizadas em diversas idades, não são capazes de predizer a real condição de funcionalidade do órgão, tampouco identificar processos patológicos de base celular[6]. No presente estudo, a ocorrência de alteração mais expressiva na homogeneidade do parênquima testicular ocorreu durante a Primavera. Esta estação climática se caracteriza por ser um período transicional e desafiador, que requer dos animais a expressão de características adaptativas homeostáticas. A termorregulação insuficiente nesse período pode determinar redução na qualidade seminal de touros mantidos permanentemente em ambiente com altos índices de temperatura e umidade[7]. As alterações na estrutura e a presença de microlitíases no parênquima testicular são indícios de comprometimento gonadal

e estão diretamente relacionadas à redução na produção espermática8. A maior incidência de pontos hiperecoicos no parênquima testicular foi relatada na Primavera e, pontualmente, dentro dos sistemas estudados, podendo ser um reflexo da intensidade e da duração do desafio térmico ao qual os animais foram expostos[9]. Diversos estudos demonstram que touros com parênquima testicular comprometido devido ao estresse pelo calor produzem ejaculados com menor qualidade.[7,10,11]

Considerações Finais – Baseado no presente estudo, ressalta-se a importância do efeito do sombreamento disponibilizado pelo sistema de integração lavoura-pecuária-floresta nas características do parênquima testicular de touros ao longo do ano, principalmente durante a Primavera. Esta informação serve como fator adicional para impulsionar a adoção de sistemas arborizados como estratégia de manejo na preparação de touros de corte para a estação de monta. Contudo, abordagens complementares quanto à qualidade seminal e à fertilidade dos animais mantidos em sistemas arborizados são requeridas, o que amplia possibilidades de estudos em uma relevante linha de pesquisa em pecuária tropical.

Referências bibliográficas

[1] Summer, A.; Lora, I.; Formaggioni, P.; Gottardo, F. (2019). Impact of heat stress on milk and meat production. *Anim Front* 9:39-46.

[2] Pezzopane, J. R. M.; Nicodemo, M. L. F.; Bosi, C.; Garcia, A. R.; Lulu, J. (2019). Animal thermal comfort indexes in silvopastoral systems with different tree arrangements. *J Therm Biol* 79:103-111.

[3] IPCC - The Intergovernmental Panel on Climate Change (2019) IPCC Reports, Final Government Draft versions. Chapter 5: Food Security. https://www.ipcc.ch/srccl-report-download-page/ Acesso em: 05 set. 2019.

[4] Kahwage, P. R.; Esteves, S. N.; Jacinto, M. A. C.; Barioni Junior, W.; Pezzopane, J. R. M.; Pantoja, M. H. A.; Bosi, C.; Miguel, M. C. V.; Mahlmeister, K.; Garcia, A. R. (2017) High systemic and testicular thermolytic efficiency during heat tolerance test reflects better semen quality in rams of tropical breeds. Int J Biometeorol.

[5] CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.* 3. ed. Belo Horizonte, Brasil, p 104

[6] Palmer, C. W. (2016) Management and Breeding Soundness of Mature Bulls. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*.32:479-95.

[7] Garcia, A. R. (2017) Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Rev Bras Reprod Anim* 41: 33-39.

[8] Dogra, V. S.; Gottlieb, R. H.; Oka, M.; Rubens, D. J. (2003) Sonography of the Scrotum. *Radiology* 237:18-36.

[9] Sabés-Alsina, M.; Johannisson, A.; Lundeheim, N.; Lopez-Bejar, M.; Morrell, J. M. (2017) Effects of season on bull sperm quality in thawed samples in northern Spain. *Vet Rev* 180:251.

[10] Chacur, M. G. M.; Reis, J. D. A.; Tavares, L. S.; Sanches, K.; Guaberto, L.; Alves, V. C.; Oba, E.; Ramos, A. A. (2014) Influência das épocas do ano na morfometria testicular e epididimária, características do sêmen e proteínas do sêmen em SDS-PAGE em zebus e taurinos. *Acta Sci Vet* 42:1174.

[11] Gonçalves, A. A.; Garcia, A. R.; Rolim Filho, S. T.; Silva, J. A. R.; Melo, D. N.; Guimaraes, T. C.; Tavares, H. R.; Silva, T. V. G.; Souza, E. B.; Santos, S. S. D.; Ohashi, O. M. (2021) Scrotal thermoregulation and sequential sperm abnormalities in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) under short-term heat stress. *J Therm Biol*, 96:e102842.

Agradecimentos: À Embrapa Pecuária Sudeste, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo 2019/04528-6) pelo suporte financeiro. NR é bolsista CAPES, ARG é bolsista de produtividade do CNPq.

Condições climáticas e seu reflexo na temperatura escrotal e corporal de touros Nelore

Luana Gomes Fernandes[1]
luanagfernandes95@gmail.com
Naiara Nantes Rodrigues[1]
Marcelo Sant`Ana Borges[2]
Marina de Oliveira Silva[2]
Maria Eugênia Zerlotti Mercadante[2]
Fabio Morato Monteiro[1,2]
fabiomoratomonteiro@yahoo.com.br

Abstract: The aim of the present study was to study the reflection of environmental conditions in a region of semi-humid tropical climate in the scrotal and rectal temperatures of Nellore bulls. 29 Nellore bulls were used with an average age of 30 ± 6 months and an average weight of 610 ± 88 kg. The evaluations were made in two periods. The first period was between the winter and spring seasons (September, October and November) and the second period between the summer and autumn seasons (March, April and May). Scrotal temperature was measured by infrared thermography and rectal temperature by digital thermometer. Surface temperatures of the scrotum were higher in the months of higher temperature and humidity (October and November). However, rectal temperature remained within the normal range for the species. In conclusion, environmental conditions directly influence scrotal temperature, and with lower proportion in the rectal temperature of animals.

Keywords: Humidity; Temperature; Termography.

Palavras-chave: Umidade; Temperatura; Termografia.

Introdução – Regiões de clima tropical e subtropical são desafiantes para a animais de produção, pela predominância de altas temperaturas e umidades. Situações ambientais adversas podem comprometer a eficiência dos mecanismos termorregulatórios e dificultar a dissipação de calor, levando o animal a estresse térmico[1]. Como consequência, danos diretos e indiretos nas funções reprodutivas podem ser observados. Atualmente os índices de conforto térmico são usados para monitoramento de variáveis climáticas e caracterização de zonas de conforto térmico, dentre eles, o índice de temperatura e umidade (ITU). Além disso, juntamente com a termografia infravermelha (TIV) podem contribuir para avaliação do efeito de altas temperaturas ambientais sobre a termorregulação dos animais[2]. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar as condições ambientais em região de clima tropical semiúmido e seu reflexo na temperatura superficial do escroto mensurada por termografia infravermelha e na temperatura retal de touros Nelore.

[1] UNESP-FCAV.
[2] Centro APTA Bovinos de Corte, IZ.

Material e Métodos – O estudo foi conduzido no Instituto de Zootecnia (Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Bovinos de Corte) no município de Sertãozinho-SP- Brasil, situado a 21º10'de latitude sul e 48º5'de longitude oeste, em região de clima tropical semiúmido. Foram utilizados 29 touros Nelore com idade média de 30±6 meses e peso médio de 610±88 kg. As avaliações ocorreram em dois períodos. O primeiro período foi entre as estações de inverno e primavera (setembro, outubro e novembro) e o segundo período entre as estações de verão e outono (março, abril e maio). As avaliações foram realizadas com intervalo de 28 dias entre elas. Os animais eram conduzidos ao curral no início da manhã e aguardavam cerca de 30 minutos antes do início das avaliações, para evitar a influência do manejo nas variáveis analisadas. Em cada avaliação era realizado registro termográfico do escroto, temperatura retal e verificações de temperatura e umidade relativa do ar. Os termogramas foram registrados com câmera termográfica portátil (FLIR T420, FLIR Systems Inc., EUA) e posteriormente analisados pelo Software Researcher IR 4 (FLIR Systems Inc., EUA). Para cada touro, a temperatura da superfície escrotal foi mensurada a 1 metro de distância e com a câmera orientada perpendicularmente ao escroto. A análise consistiu em duas linhas traçadas de um lado a outro na imagem do escroto, para mensurar a temperatura do polo proximal (TPP) e do polo distal (TPD) do escroto[2]. A partir disto, o gradiente de temperatura (GT) foi calculado pela diferença entre TPP e TPD. A temperatura retal foi mensurada por meio de termômetro clínico digital. Os dados de temperatura e umidade do ar foram coletados na estação meteorológica automática do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2020), situada à 21º21'34" de latitude sul, 48º03'56" de longitude oeste e 538 metros de altitude. O ITU D7 foi calculado considerando a média de temperatura e umidade dos sete dias anteriores a avaliação de termografia e o ITU D0 foi referente ao dia da avaliação de termografia infravermelha[3]. Para determinação do ITU foi utilizado a fórmula descrita por Thom[4]: ITU = {0,8xT + (%UR/100) x (T-14,4) + 46,4}. As análises de variância foram realizadas utilizando-se o procedimento PROC MIXED do programa SAS®. As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ("LSMEANS") e comparados, quando necessário, por meio da probabilidade da diferença ("PDIFF"), usando teste "t". A significância estatística foi declarada quando P<0,05.

Resultados e Discussão – A figura 1 apresenta a variação climática nos meses de avaliação e no intervalo entre elas. Os valores médios de ITU e seu reflexo na temperatura superficial do escroto, assim como, na temperatura retal dos touros Nelore estão apresentados na Tabela 1. A termorregulação testicular é influenciada pela sazonalidade e condições térmicas ambientais. Em situações de termorregulação ineficiente, o estresse térmico se inicia e pode ser considerado uma das principais causas de subfertilidade em touros[1]. Para que a espermatogênese normal aconteça é necessário que a temperatura testicular esteja abaixo da temperatura corporal, no entanto, quando a temperatura testicular é elevada pode resultar em prejuízos à espermatogênese e consequente redução da qualidade espermática[5].

Tabela 1. Média estimada do Índice de Temperatura e Umidade, das temperaturas superficiais do escroto e da temperatura retal dos touros durante os meses experimentais.

Variáveis							EPM	*P*
	Set	Out	Nov	Mar	Abr	Mai		
ITU D7	68,83[c]	71,63[b]	72,88[a]	72,47[a]	72,28[a]	71,48[b]	0,20	<0,0001
ITU D0	65,09[c]	74,10[a]	74,33[a]	71,77[b]	70,20[b]	71,96[b]	0,72	<0,0001
TPP (˚ C)	34,61[b]	35,75[a]	35,50[a]	34,37[b]	34,48[b]	35,93[a]	0,28	<0,0001
TPD (˚ C)	30,64[b]	32,21[a]	31,95[a]	30,93[b]	30,85[b]	31,53[ab]	0,34	<0,0001
GT (˚ C)	3,94[ab]	3,52[b]	3,51[b]	3,41[b]	3,61[b]	4,39[a]	0,26	0,0901
TR (˚ C)	38,22[bc]	38,60[a]	38,32[ab]	38,48[ab]	37,94[c]	38,44[ab]	0,14	0,0011

ITU: índice de temperatura e umidade (D7: sete dias anteriores as avaliações termográficas; D0: no dia das avaliações termográficas), TPP: temperatura do polo proximal do escroto, TPD: temperatura do polo distal do escroto, GT: gradiente de temperatura escrotal, TR: temperatura retal. EPM: Erro padrão da média. Letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças estatísticas (P<0,05).

Para avaliar as condições ambientais as quais os animais são submetidos, o ITU é considerado um excelente indicador térmico e pode ser interpretado com base na escala usada para categorizar os níveis de estresse térmico pra bovinos: normal (ITU < 74), alerta (74 ITU < 79), perigo (79 ITU < 84), e emergência (ITU ≥ 84)[6]. Estudos têm relatado que valores médios de ITU estão diretamente relacionados as temperaturas escrotais mensuradas por meio de termografia infravermelha[2,7]. Este fato, corrobora com os dados obtidos no presente estudo, em que as temperaturas de ambos os polos do escroto foram maiores nos meses de maior ITU. Ainda na avaliação realizada por TIV, foi determinado o GT por meio da diferença de temperatura entre os polos do escroto. A diminuição gradativa da temperatura superficial do polo proximal para o distal do escroto sugere adequada termorregulação e menores valores de GT já foram associados a termorregulação menos eficiente[2]. No presente estudo, os maiores gradientes de temperatura foram observados na primeira avaliação realizada no final do inverno (setembro), e na última realizada no final do outono (maio). Resultados semelhantes ao presente estudo foram observados em touros Braford, onde o GT foi maior no inverno comparado com o verão (0,9°C)[2]. Segundo Kastelic *et al.*[8] essa variação no gradiente de temperatura se deve pelo arranjo da vasculatura no escroto, de tal forma que os gradientes de temperatura escrotal e testicular são fisiologicamente inversos, e altamente envolvidos com a manutenção da homeostase testicular. A temperatura retal é considerada indicador fisiológico consistente para a temperatura corporal. No presente estudo, mesmo nos meses em que o ITU se apresentou dentro da faixa de alerta para estresse térmico, a temperatura retal média permaneceu dentro da faixa considerada normal para bovinos, de 38,1 a 39,1°C[9]. O que indica que as condições ambientais não foram capazes de prejudicar a capacidade termolítica dos touros[1].

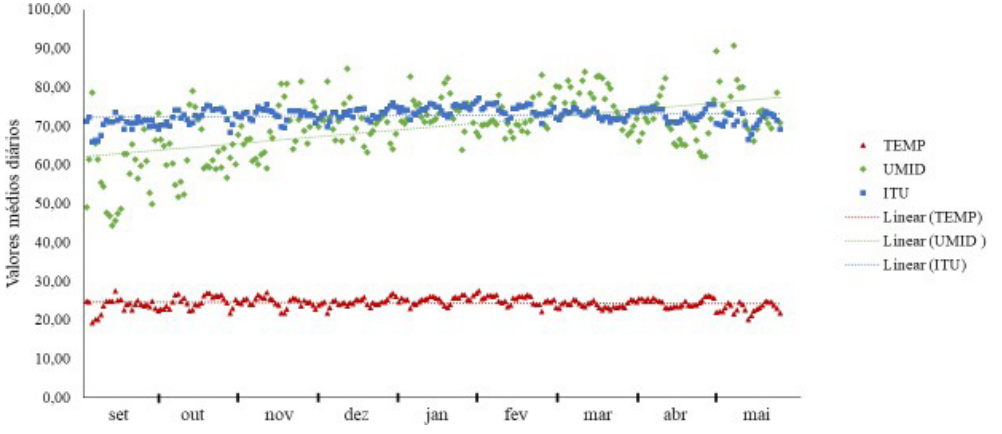


Figura1. Valores médios diários de temperatura (°C), umidade relativa do ar (%), e índice de temperatura e umidade (ITU) dura todo período experimental.

Considerações Finais – A termografia infravermelha é uma ferramenta eficaz de mapeamento térmico do escroto. Touros Nelore são eficientes em manter a homeotermia mesmo em situações de alerta para estresse térmico.

Referências bibliográficas

[1] Romanello, N.; Brito, J. de; Junior, L.; Junior, W. B.; Brandão, F. Z.; Marcondes, C. R. *et al*. Thermoregulatory responses and reproductive traits in composite beef bulls raised in a tropical climate. *Int J Biometeorol*. 2018;

[2] Menegassi, S. R. O.; Barcellos, J. O. J.; Dias, E. A.; Koetz, C.; Pereira, G. R.; Peripolli, V. *et al*. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Brafordbulls. *Int J Biometeorol*. 2015;59(3):357–64.

[3] Freitas, A. de P.; dos Santos, G. F. F.; Fernandes, A. R.; Mendonça, G. G.; de Paz, C. C. P.; Vercesi Filho, A. E. *et al*. Effect of thermal stress on basic seminal characteristics of Gyr bulls. *Int JBiometeorol*. 2020;64(10):1649–56.

[4] Thom, E. C. *The Discomfort Index*. v. 12. 1959. 57–61 p.

[5] Garcia-Oliveros, L. N.; de Arruda, R. P.; Batissaco, L.; Gonzaga, V. H. G.; Nogueira, V. J. M.; Florez- Rodriguez, S. A. *et al*. Heat stress effects on bovine sperm cells: a chronological approachto early findings. *Int J Biometeorol*. 2020;64(8):1367–78.

[6] Saizi, T.; Mpayipheli, M.; Idowu, P. A. Heat tolerance level in dairy herds: A review on coping strategies to heat stress and ways of measuring heat tolerance. *J Anim Behav Biometeorol*. 2019;7(2):39–51.

[7] Barros, D. V.; Silva, L. K. X.; Kahwage, P. R.; Júnior, J. B. L.; Sousa, J. S.; Silva, A. G. M. *et al*. Assessmentof surface temperatures of buffalo bulls. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2016;68(2):422–30.

[8] Kastelic, J. P.; Coulter, G. H.; Cook, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, andintraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology*. 1995;44(95):147–52.

[9] Robinson, E. N. Termorregulação. In: Cunningham, J. G. (ed) Tratado de fisiologia veterinária. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. p. 559-568.

Agradecimentos: A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a primeira autora.

Terapia Fotodinâmica para tratamento de acropostite em touro: Relato de caso

Carla Patricia Teodoro de Carvalho[1]
patriciacarvalho2008@gmail.com
Fabio Celidonio Pogliani[2]
Eneiva Carla Carvalho Celeghini[3]
Gabriela Alves Reis[2]
Rafael Cuel Bortoletto[1]
Felipe Casellatto Antonioli[1]
Rubens Paes de Arruda[1]
Orientador: arrudarp@usp.br

Abstract: Acropostitis is an inflammatory and infectious process of the tip of the foreskin, which occurs during penile exposure, affecting the internal leaflet of the foreskin and generally associated with wounds, ulcers, edema, necrosis, fibrosis and narrowing of the preputial ostium. Bacterial infection wounds are common complications that occur during acropostitis and can delay healing. An alternative way to promote bacterial photoinactivation and tissue repair is the use of photodynamic therapy (PDT). PDT combines a photosensitizer, molecular oxygen and a light source to produce oxygen reactive species (ROS) that inactivate microbial cells, with no selection of multidrug-resistant pathogens.

Keywords: *Foreskin; Infection; Photoinactivation.*

Palavras-chave: *Fotoinativação; Infecção; Prepúcio.*

Introdução - A acropostite é caracterizada como um processo inflamatório e infeccioso da extremidade do prepúcio, geralmente associado às feridas, úlceras, edema, necrose, fibrose e, às vezes estreitamento do óstio prepucial. As lesões ocorrem durante a exposição peniana, acometendo o folheto interno do prepúcio, porém, existem lesões secundárias ao prolapso crônico que podem culminar na obstrução total do orifício prepucial [1]. Na maioria das vezes intervenções cirúrgicas são necessárias para o tratamento de acropostite. Com isto, gerando custo elevado, necessidade de Médico-Veterinário especializado, perdas econômicas relacionadas ao tempo de convalescença sem contar que em algumas vezes perda de libido do touro e até mesmo insucesso cirúrgico. Desta forma, deve-se considerar o descarte do animal e tratamento conservativo. Embora o tratamento cirúrgico seja o mais indicado, terapias

[1] Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

[2] Centro de Apoio ao Ensino e Pesquisa (CAEP), Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

[3] Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

alternativas e não invasivas podem ser utilizadas, como a Terapia Fotodinâmica (*photodynamic therapy* - PDT). A Terapia Fotodinâmica consiste na administração tópica ou sistêmica de agente fotossensibilizador (AF) seguida da irradiação de luz em comprimento de onda específico e ressonante e presença de oxigênio molecular [2]. O AF reage com a luz por meio da absorção de fótons, passando do estado fundamental para o estado ativado. Na presença de oxigênio, o AF ativado, reage com as moléculas vizinhas por meio de transferência de elétrons ou hidrogênio, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (reação do tipo I) ou, por meio de transferência de energia ao oxigênio, resultando na produção de oxigênio singlete (reação do tipo II) [3]. As células-alvo (bactérias, fungos, protozoários, vírus, algas e células neoplásicas) nas quais o AF se acumula serão fotoinativadas após a irradiação, sendo a reação, portanto, tóxica para micro-organismos e neoplasias [4, 5]. Essa terapia é utilizada na prevenção e tratamento de feridas [6], acelera o processo de cicatrização, contribui no controle inflamatório e bacteriano [7] e não induz seleção de micro-organismos resistentes [5]. Tem como vantagens a utilização de baixa concentração de fotossensibilizador, reduzido custo e, no uso tópico, tem como diferencial a absorção local, não apresentando absorção sistêmica e, portanto, não há resíduos em leite e carne [5]. O azul de metileno é um AF derivado das fenotiazinas e com larga banda de absorção, entre 500 e 700nm, sendo predominante com 664nm. Quanto maior for a concentração de azul de metileno, maior tendência de redução da carga microbiana, sendo uma alternativa para o tratamento de feridas infectadas por bactérias gram positivas e negativas, nas quais a eliminação e/ou inibição microbiana reduzem o tempo de reparo tecidual [7]. O objetivo deste estudo foi relatar a Terapia Fotodinâmica como alternativa terapêutica no tratamento da acropostite em bovinos.

Relato de caso – No dia 04 de janeiro de 2021, touro de seis anos, da raça *Nelore*, pesando 1.100 kg, pertencente ao *Campus* Fernando Costa da Universidade de São Paulo em Pirassununga, apresentou alteração na região do prepúcio. Ao exame clínico, apresentou lesões e grave inflamação local caracterizadas por: aumento de volume significativo, com consistência firme à palpação, em região cranial, sensibilidade à palpação, edema e diminuição da luz prepucial na região distal. Imediatamente o touro foi retirado do piquete com pastagem alta e mantido em local apropriado e instituído tratamento com penicilina benzatina (20.000UI/kg) no controle da infecção e, para redução da inflamação e controle da dor, flunixina meglumina (1.1 mg/kg) sistêmicos, associados a medidas para diminuição do edema na região do prepúcio, utilizando duchas de água fria, bem como, o uso de furosemida (1 mL para cada 10kg) e curativos tópicos diários com pomada cicatrizante (Ricinus®, Vansil Ltda), confecção de bandagem protetora sobre a lesão e spray prata repelente e antimicrobiano. Embora o tratamento tenha sido iniciado rapidamente, ocorreu agravamento das lesões e o animal apresentou extensa lesão ulcerada e com tecido necrótico em região caudal (Figura 1A) do tecido prepucial. Após 10 dias realizando curativos e não apresentando reposta positiva ao tratamento, iniciou-se a Terapia Fotodinâmica utilizando-se cluster composto por seis *light-emitting diodes* (LEDs) vermelhos (350mW/Led - Vetlight, DMC Ltda, Brasil; $\lambda = 660nm \pm 10nm$; $A = 13{,}20\ cm^2$; $I = 120mW/cm^2$) associado à aplicação tópica do AF azul de metileno 0,1% (Figura 1B), com 5 min de tempo de espera pré-irradiação, nas áreas lesionadas do

prepúcio. Inicialmente a Terapia Fotodinâmica foi realizada por cinco dias consecutivos (Figura 1C) e posteriormente em 25 dias alternados, totalizando 30 dias de aplicação da terapia fotodinâmica (Figura 1D).

Resultados e Discussão – As características morfológicas e anatômicas de touros zebuínos predispõem o desenvolvimento de lesões na lâmina interna do prepúcio e consequentemente acropostite gerando perdas reprodutivas e econômicas [3]. Geralmente os tratamentos para afecções prepuciais são de alto custo e longa duração, ainda que na maioria das vezes são necessárias intervenções cirúrgicas [1]. Contudo, o tratamento cirúrgico comumente pode gerar complicações no pós-operatório sendo, portanto, indicado o uso da PDT como alternativa terapêutica conservadora. A Terapia Fotodinâmica foi eficiente no tratamento de acropostite, reduzindo a contaminação, promovendo a recuperação tecidual e evitando o crescimento de tecido hiperplásico, mesmo não associando a terapia sistêmica, e permitindo a recuperação da lesão em 30 dias (Figura 1D). Embora a terapia fotodinâmica seja descrita desde de 1901, esta tem ganhado destaque nas últimas décadas, principalmente pela sua indicação no tratamento de neoplasias malignas e benignas e no tratamento de lesões infectadas, em humanos e animais [4, 5]. Mesmo com diversidade de aplicações dentro da Medicina Veterinária, não encontramos relatos do uso da PDT em afecções de trato reprodutivo em touros, assim, nossos resultados demonstram, nos parâmetros utilizados, ser uma alternativa conservadora, eficiente e viável para o tratamento da acropostite.

Figura 1: A) Prepúcio com presença de tecido necrosado, inflamação grave e contaminação; **B)** 1° dia do tratamento com terapia fotodinâmica; **C)** 5° dia do tratamento com Terapia Fotodinâmica; **D)** 30° dia do tratamento com Terapia Fotodinâmica

Considerações Finais - A utilização da Terapia Fotodinâmica foi eficiente no tratamento de acropostite em touro, promovendo a recuperação tecidual e redução do processo inflamatório. Ainda, além de ser uma terapia de baixo custo, não invasiva, evitou intervenção cirúrgica e potenciais complicações após o procedimento no prepúcio do touro.

Referências bibliográficas

[1] Rabelo, R. E.; Silva, L. A. F.; Silva, O. C.; Vulcani, V. A. S. *Cirurgia do Aparelho reprodutor de Machos Bovinos e Equinos*. 1. ed. Jataí, Goiás; 2017.

[2] Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kulbacka, J. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *106*, 1098-1107, 2018. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049.

[3] Rabelo, R. E.; Vulcani, V. A. S.; Cardoso, L. D.; Dutra, H. T.; Helrgiel, P. A.; Vicentin, F. R. Aspectos anatômicos e sua relação com as enfermidades do prepúcio e pênis no touro. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 9(18), 2012.

[4] Silva, Z. S.; Bussadori, S. K.; Fernandes, K. P. S.; Huang, Y. Y.; Hamblin, M. R. (2015). Animal models for photodynamic therapy (PDT). *Bioscience reports*, *35*(6). https://doi.org/10.1042/BSR20150188

[5] Sellera, F. P.; Gargano, R. G.; Della Libera, A. M. M. P.; Benesi, F. J.; Azedo, M. R.; Sá, L. R. M.; Ribeiro, M. S.; Baptista, M. S.; Pogliani, F. C. Antimicrobial photodynamic therapy for caseous lymphadenitis abscesses in sheep: Report of ten cases. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy,* 13, p. 120-122, 2016. http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.12.006

[6] Sun, Z.; Zhang, L-P.; Wu, F.; Zhao, Y. Photosensitizers for two-photon excited photodynamic therapy. *Advanced Functional Materials*, 27, 1704079, 2017. https://doi.org/10.1002/adfm.201704079

[7] Hamblin, M. R.; O'Donnell, D. A.; Murthy, N.; Contag, C. H.; Hasan, T. Rapid Control of Wound Infections by Targeted Photodynamic Therapy Monitored by In Vivo Bioluminescence Imaging¶. *Photochemistry and photobiology*, *75*(1), 51-5, 2002. https://doi.org/10.1562/0031-8655(2002)0750051RCOWIB2.0.CO2

Agradecimentos: À CAPES pelo fornecimento da bolsa de Doutorado.

Qualidade seminal de caprinos jovens experimentalmente infectados por *Trypanosoma vivax*

Letícia Reis Manólio[1]
leticia.manolio@unesp.br
Amanda Kassem Samour[1]
Beatriz Eustachio Boarini[1]
Gwennever Camargo Moraes[1]
Maísa Panzani Santos[1]
Sarah Daccach[1]
Viviane Bobadilha Morelli[1]
Alessandra Regina Carrer[1]
Letícia de Castro Fiori[1]
Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto[1]
Guilherme Fazan Rossi[1]
Marcos Rogério André[1]
Rosangela Zacarias Machado[1]
Claudia Cristina Paro de Paz[2]
Lindsay Unno Gimenes[1]
lindsay.gimenes@unesp.br

Abstract: The aim was to evaluate the seminal changes of young goats experimentally infected by *T. vivax*. Thirteen Saanen male goats, aging 6 to 9 months, were experimentally infected with 1x 10^4 tripomastigotes on D0. Semen was collected by artificial vagina on D-3, and weekly from D6 to D41. Data were analyzed by logistic regression ($P \leq 0.05$). Compared to D-3, an increase in volume was observed between D13 to D34, in major and total sperm defects from D27, and in minor sperm defects from D34. Motility, vigor, and concentration were no affected by time. In conclusion, infection in young goats by *T. vivax* promoted an increase in sperm defects after 27 days of experimental inoculation. Despite an increase in volume during the experimental period, no other changes in physical characteristics of semen were observed. This is the first report on the impact of the agent on seminal quality of goats.

Keywords: goat; semen; trypanosomiasis.

Palavras-chave: caprino; sêmen; tripanossomíase.

Introdução - A tripanossomíase é causada por um protozoário do gênero *Trypanosoma,* que afeta tanto humanos como animais domésticos e selvagens. Relata-se queda na produção leiteira, anemia, problemas reprodutivos, chegando à infertilidade e alta taxa de abortamento [1].

[1] Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

[2] Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios.

T. vivax é de importância para os animais domésticos devido à sua capacidade de adaptação e sobrevivência em lugares onde o vetor biológico habitual está ausente [2].

Em machos, a enfermidade causada pelo *T. vivax* pode gerar degeneração testicular e de epidídimos [3; 4], ocasionando queda no volume, motilidade e concentração, além de aumento no percentual de patologias espermáticas em ovinos e bovinos [5; 6]. Entretanto, há estudos conduzidos nestas mesmas espécies nos quais não foram observadas alterações na concentração [7; 8], volume [7], motilidade ou vigor [8].

Em caprinos há apenas um relato de alterações microscópicas testiculares após infecção por *T. vivax* [3], contudo, não foram encontrados até o momento, estudos avaliando o impacto da infecção na qualidade espermática nesta espécie.

Portanto, o objetivo no presente estudo foi avaliar, de forma inédita, o impacto da infecção experimental por *T. vivax* nas características físicas e morfológicas do sêmen de caprinos jovens.

Material e Métodos - Treze caprinos da raça Saanen, com idade entre 6 e 9 meses e peso médio inicial (± EPM) de 30,2 ± 0,5 kg, foram mantidos em baias dentro de uma instalação telada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP. Somente animais negativos para DNA de *T. vivax* foram utilizados no experimento. O dia da inoculação foi considerado o D0, quando os animais receberam 1 x 10^4 tripomastigotas de *T. vivax* da cepa Miranda, sendo o estudo conduzido em duas repetições. Foram realizadas colheitas de sêmen pelo método de vagina artificial no D-3, D6, D13, D20, D27, D34 e D41 e as amostras foram avaliadas quanto ao volume, à motilidade, ao vigor, à concentração e à morfologia espermática. Os dados foram submetidos à análise de regressão logística (PROC GENMOD, SAS), incluindo o efeito fixo de momento de avaliação e repetição como covariável. As médias foram comparadas por LSMeans e considerou-se significância valores de P ≤0,05.

Resultados e Discussão – Nos caprinos jovens do presente estudo, observou-se aumento de volume (P = 0,01) entre o D13 e D34. Quanto às outras características físicas do sêmen, não houve efeito da infecção por *T. vivax* sobre a motilidade (P = 0,90), o vigor (P = 0,20) ou a concentração (P = 0,86; Tabela 1). Embora a maioria dos trabalhos indique queda de volume, motilidade, vigor e concentração espermáticos [5; 6; 9], achados similares ao do presente estudo também foram descritos previamente, incluindo o inesperado aumento de volume do ejaculado [6]. Em relação ao momento pré-inoculação (D-3), houve aumento no percentual de defeitos maiores e totais a partir dos 27 dias pós-inoculação (P < 0,01) e de defeitos menores a partir dos 34 dias pós-inoculação (P < 0,01). Dentre os defeitos espermáticos maiores foram identificados descolamento de acrossomo, defeitos de acrossomo (rugoso, grânulos, vacúolos, defeito diadema), contorno anormal, defeitos de cabeça (cabeça isolada patológica, estreita na base, piriforme), gota citoplasmática proximal, aplasia de peça intermediária (*tail stump defect*), defeitos de peça intermediária (fratura, edema, pseudogota, desfibrilação, defeito em saca- rolhas), formas teratológicas (peça intermediária dupla) e defeitos de cauda (fortemente enrolada com gota, fortemente enrolada na cabeça, fortemente enrolada/ do-

brada). Quanto aos defeitos menores, foram encontrados defeitos de cabeça (cabeça isolada normal, pequena, curta, delgada, larga, gigante, chata), gota citoplasmática distal, defeitos de peça intermediária (implantação retroaxial, oblíqua) e predominância de defeitos de cauda (cauda enrolada/ dobrada). Conforme relatos prévios, o aumento de defeitos espermáticos é esperado em decorrência da degeneração testicular provocada pelo agente etiológico, com variação no início da manifestação (entre a 2ª a 6ª semana pós-infecção) [5; 6; 7]; e gravidade do acometimento testicular, podendo chegar a azoospermia. No presente estudo, dois animais apresentaram queda de libido no D20, oligozoospermia e elevada teratospermia (incluindo a presença de células gigantes) no D27, culminando com azoospermia no D34.

Tabela 1. Médias ajustadas (± EPM) das características físicas e morfológicas do sêmen de caprinos jovens infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*, cepa Miranda (n = 13; D0: dia da inoculação de 1 mL de sangue contendo 1 x 10^4 tripomastigotas metacíclicos)

	D-3	D6	D13	D20	D27	D34	D41
Volume (µL)	$360{,}9^{a}$ ± 0,0004	$572{,}6^{ab}$ ± 0,0003	$762{,}8^{a}$ ± 0,0002	$892{,}8^{a}$ ± 0,0002	$607{,}8^{a}$ ± 0,0003	$608{,}0^{a}$ ± 0,0003	$453{,}4^{ab}$ ± 0,0005
Motilidade (%)	71,0 ± 0,003	62,3 ± 0,003	65,6 ± 0,003	55,4 ± 0,004	54,7 ± 0,004	53,2 ± 0,004	48,3 ± 0,007
Vigor	4,3 ± 0,013	4,1 ± 0,013	4,7 ± 0,012	4,1 ± 0,015	4,3 ± 0,013	4,1 ± 0,013	3,5 ± 0,025
Concentração ($x10^9$/ mL)	3,00 ± 0,07	3,03 ± 0,07	3,60 ± 0,06	3,41 ± 0,07	3,53 ± 0,06	2,93 ± 0,07	1,96 ± 0,17
Defeitos Maiores (%)	$4{,}8^{ab}$ ± 0,05	$5{,}2^{abc}$ ± 0,05	$4{,}6^{a}$ ± 0,05	$9{,}3^{bcd}$ ± 0,03	$9{,}6^{cd}$ ± 0,02	$13{,}3^{de}$ ± 0,02	$17{,}3^{e}$ ± 0,02
Defeitos Menores(%)	$8{,}1^{a}$ ± 0,02	$7{,}1^{a}$ ± 0,03	$7{,}8^{a}$ ± 0,02	$9{,}8^{ab}$ ± 0,02	$10{,}6^{ab}$ ± 0,02	$18{,}0^{c}$ ± 0,01	$14{,}0^{bc}$ ± 0,01
Defeitos Totais (%)	$12{,}9^{a}$ ± 0,01	$12{,}3^{a}$ ± 0,01	$12{,}4^{a}$ ± 0,01	$19{,}1^{ab}$ ± 0,01	$20{,}2^{b}$ ± 0,01	$31{,}3^{c}$ ± 0,01	$32{,}9^{c}$ ± 0,01

a ≠ b: diferentes letras sobrescritas são significativas (P ≤ 0,05). Médias ajustadas de acordo com o modelo por LS Means.

Considerações Finais – No presente estudo, a infecção em caprinos jovens por *Trypanosoma vivax* promoveu aumento de defeitos espermáticos a partir de 27 dias da inoculação experimental. A despeito de ter havido aumento de volume do ejaculado, não foram observadas alterações nas outras características físicas do sêmen. Até o momento, este é o primeiro relato sobre o impacto do agente na qualidade seminal de caprinos.

Referências bibliográficas

[1] Lopes, T. W.; Dávila, A. M. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. *Acta Scientiae Veterinariae* 2018; 46; 287.

[2] Anosa, V. O. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminants, horses and rodents. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe* B 1983; 30; 151-160.

[3] Anosa, V. O.; Isoun, T. T. Further observations on the testicular pathology in *Trypanosoma vivax* infection of sheep and goats. *Research in Veterinary Science* 1980; 11; 123-127.

[4] Bezerra, F. S. B.; Batista, J. S. Efeitos da infecção por *Trypanosoma vivax* sobre a reprodução: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica* 2008; 2; 61-66.

[5] Agu, W. E.; Ige, K.; Olantude, D. S. Evaluation of semen quality of rams infected with *Trypanosoma vivax*. *Animal Reproduction Science* 1986; 11; 123-127.

[6] Sekoni, V. O. Effect of *Trypanosoma vivax* infection on semen characteristics of yankasa rams. *British Veterinary Journal* 1992; 146; 175-180.

[7] Akpavie, S. O.; Ikede, B. O. Ejaculate characteristics of sheep infected with *Trypanosoma brucei* and *T vivax*: changes caused by treatment with diminazene aceturate. *Research in Veterinary Science* 1987; 42; 1-6.

[8] Bittar, J. F. F.; Bassi, P. B.; Moura, D. M.; Garcia, G. C.; Martins Filho, O. A.; Vasconcelos, A. B.; Silva, M. F. C.; Barbosa, C. P.; Araújo, M. S. S.; Bittar, E. R. Evaluation of parameters related to libido and semen quality in Zebu bulls naturally infected with *Tripanosoma vivax. BMC Veterinary Research* 2015; 11; 261- 266.

[9] Sekoni, V. O.; Kumi-Diaka, J.; Saror, D.; Njoku, C. The effect of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infections on the reaction time and semen characteristics in the zebu bull. *British Veterinary Journal* 1988; 144; 388-394.

Agradecimentos: À FAPESP pelo Auxílio à Pesquisa (PROC: 2019/22695-7) e Bolsas de Iniciação Científica (2020/06492-0, 2020/06493-2 e 2020/07152-4).

Alternativas farmacológicas para o controle da dor e desconforto associados à eletroejaculação em ovinos

Mariana Karla Francolino da Silva[1]
marianakarlafs@gmail.com
Leonardo de Almeida Gélio[1]
Kleber da Cunha Peixoto Jr.[1]
Eunice Oba[2]
Douglas Anderson de Freitas[3]
Renata Elisa Green[4]
André Maciel Crespilho[1,5]
andremacc@yahoo.com.br

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effect of different local anesthetic block protocols for reducing discomfort during electroejaculation in rams. Four Dorper rams were selected and submitted to 5 treatments: electroejaculation without anesthetic (Control), electroejaculation with ventral hypogastric nerve block using lidocaine 2% (T2), or the combination of lidocaine and fentanyl (T3); electroejaculation with perineal hypogastric nerve block using lidocaine 2% (T4) and using lidocaine plus fentanyl (T5). Their physiological stress and behavior responses, serum cortisol concentration, CK enzyme and semen quality were evaluated. There were no variations in blood pressure, seminal quality parameters, and cortisol between treatments. Treatments that received anesthetic block with the association of lidocaine and fentanyl showed lower incidence of ataxia ($P<0.0001$) and lower concentrations of CK post electroejaculation. It is concluded that the association of fentanyl and lidocaine, independently of nerve access, results in less discomfort for animals submitted to electroejaculation.

Keywords: stress; small ruminants; semen.

Palavras-chave: estresse; pequenos ruminantes; sêmen.

Introdução - A coleta de sêmen através de eletroejaculação (EE) envolve a indução do reflexo ejaculatório a partir de estimulação elétrica deflagrada no assoalho da ampola retal. Devido à proximidade anatômica da inervação envolvida no processo ejaculatório com importantes nervos motores como o isquiático e obturador, ocorre intensa contração muscular involuntária, dor e desconforto associados a EE (ABRIL-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de duas vias para bloqueio local da inervação hipogás-

[1] Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo/SP.
[2] FMVZ-UNESP, Botucatu/SP.
[3] Comprove – Diagnósticos Veterinários, Barueri/SP.
[4] Santos & Green Ltd. – Dunedin (9010), New Zealand
[5] VetSmen - Análise de Sêmen para Inseminação Artificial, Barueri/SP.

trica e dois protocolos anestésicos sobre parâmetros de qualidade espermática, manifestações clínicas, perfil hormonal, bioquímico e comportamental de ovinos submetidos à EE.

Material e Métodos - Para o estudo foram selecionados 4 ovinos da raça Dorper com idade média de 6 anos. Os quatro reprodutores foram submetidos a 5 tratamentos, com 3 repetições/tratamento: Controle **(T1)**; **T2**: bloqueio anestésico a partir de acesso ventral da inervação hipogástrica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2% (2,5mg/kg); **T3**: bloqueio ventral da inervação hipogástrica utilizando associação de lidocaína 2% e citrato de fentanila, respectivamente nas doses 2,5 mg/kg e 800mcg/kg;**T4**: bloqueio da inervação hipogástrica através do acesso perineal, utilizando o mesmo protocolo anestésico de **T2**; **T5**: bloqueio da inervação hipogástrica através do acesso perineal, utilizando mesma associação de **T3**. Após 15 minutos da realização dos bloqueios anestésicos os animais foram submetidos à EE (Autojac 3, Neovet, Brasil), sendo empregada estimulação automática em intensidade média. Para a realização da coleta de sêmen os animais foram mantidos em estação, de forma independente ao tratamento adotado. Além da avaliação do sêmen pós-EE (cinética, concentração, volume, morfologia e integridade de membrana), amostras de sangue foram obtidas antes e após a eletroejaculação para quantificação de cortisol sérico pela técnica de radioimunoensaio (Bechman Coulter, Indianapolis, USA), e para dosagem da enzima creatina fosfoquinase (CK) a partir de kit Laborlab® CK NAC (Guarulhos, Brazil), com leitura em analisador bioquímico semiautomático Bioplus® BIO-200. O estresse e desconforto associados à EE foram analisados a partir da aferição de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR). Adicionalmente foram observadas a ocorrência de vocalização, (escore de 0- 3, de acordo com a sua manifestação e intensidade), ataxia e decúbito, estas últimas sendo consideradas como variáveis binárias, recebendo pontuação 0 (ausência) ou 1 (ocorrência). Os dados gerados foram submetidos à análise de variância (Proc GLM®, SAS, Cary, USA), sendo considerado o efeito isolado dos diferentes tratamentos e dos diferentes protocolos anestésicos (lidocaína vs associação de lidocaína e fentanila) sobre as variáveis estudadas.

Resultados e Discussão - Não foram observadas diferenças para a pressão arterial (média, sistólica ou diastólica, avaliadas antes ou após a EE), parâmetros de qualidade seminal e ocorrência de decúbito quando comparados os diferentes tratamentos. No entanto, variações significativas foram observadas para a FC (Controle = 136,67 ± 31,90^{ab}; T2 = 154,45 ± 19,68^{a}; T3 = 130,83 ± 39,13^{ab}; T4 = 114,17 ± 39,56^{b}; T5 = 108,25 ± 16,85^{b}; P=0,0042) e FR (Controle = 67,08 ± 31,72^{a}; T2 = 90,46 ± 33,57^{b}; T3 = 41,17 ± 10,13^{c}; T4 = 44,83 ± 13,11^{ac}; T5 = 45,83 ± 16,36^{ac}; P<0,0001) pós-EE. Provavelmente a elevação da FC e FR observada para os animais submetidos ao T2 se relaciona ao maior desconforto causado pelo bloqueio anestésico a partir de acesso ventral (introdução de agulha 30x8 na porção ventral do abdome, paralelo ao arco isquiático peniano, sem a utilização do agente opioide fentanila no protocolo anestésico), que pode ser potencialmente mais traumático em relação aos demais tratamentos. A incidência de vocalização não variou entre os tratamentos, sendo observado apenas variações individuais durante a condução da EE (P=0,0066).

Elevações nas concentrações de cortisol pós-eletroejaculação foram observadas de forma independente aos tratamentos (21,29 ± 9,98 ng/mL pré-EE e 29,25 ± 16,09 ng/mL pós-EE; P=0,0253) e para todos os grupos experimentais. Maior incidência de ataxia pós eletroejaculação foi observada nos animais controle (P<0,0001). Adicionalmente, quando considerado o efeito independente do protocolo anestésico (cloridrato de lidocaína em uso isolado ou em associação), foi observada menor ocorrência de ataxia para os grupos que receberam o analgésico opioide fentanila (T3+T5) em comparação ao controle ou aos tratamentos que empregaram exclusivamente o cloridrato de lidocaína (T2+T4) para os bloqueios anestésicos (P=0,0001).

Não houve diferença para os níveis séricos de CK pré-EE comparando-se os diferentes tratamentos (P=0,3565), sendo que elevações nas concentrações dessa enzima foram observadas de forma independente aos tratamentos (125,80 ± 87,58 U/L pré-EE e 185,70 ± 153,90 U/L pós-EE; P=0,0241) para todos os grupos experimentais quando avaliados pós- eletroejaculação. Variações significativas também foram observadas para as concentrações de CK pós-EE comparando-se os diferentes protocolos anestésicos (P=0,0078), com maiores valores enzimáticos mensurados nos grupos que receberam exclusivamente lidocaína (T2+T4, 209,10 ± 156,70[b] U/L) em relação ao controle (88,52 ± 40,47[a] U/L). Tais resultados provavelmente se encontram relacionados à tendência de maior número de estímulos elétricos necessários para obtenção dos ejaculados em animais que receberam bloqueios anestésicos (T2+T4 = 35,78 ± 18,11; T3+T5 = 24,46 ± 6,21) em comparação ao controle (24,27 ± 4,56; P=0,0599). Levando-se em consideração que quanto maior o número de estímulos elétricos maior será a contração muscular involuntária associada a eletroejaculação, a elevação nas concentrações de CK podem estar relacionadas a maior incidência de lesões musculares (UNGERFELD *et al*., 2018) em animais submetidos aos bloqueios anestésicos.

Conclusões: Os bloqueios anestésicos podem reduzir a incidência de ataxia e o controle da FR de ovinos submetidos à EE. Porém, na dependência do protocolo anestésico adotado pode ocorrer aumento do número médio de estímulos elétricos necessários para a ocorrência do processo ejaculatório e, consequentemente, aumento da incidência de contrações musculares involuntárias. Dessa forma, nosso trabalho conclui que apenas bloqueios anestésicos empregando a associação de lidocaína e fentanila, independente da via de acesso, podem determinar redução da dor e desconforto associados a eletroejaculação de ovinos.

Referências bibliográficas

[1] Abril-Sánchez, S.; Freitas-de-Melo, A.; Giriboni, J.; Santiago-Moreno, J.; Ungerfeld, R. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternativetechniques. *Animal Reproduction Science*, v. 205, n. March, p. 1–9, 2019.

[2] Ungerfeld, R.; Casuriaga, D.; Giriboni, J.; Freitas-de-Melo, A.; Silveira, P.; Brandão, F. Z. Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. *Theriogenology*, v. 107,p. 1–5, 2018.

New perspectives regarding heat stress impact on fertility of *Nelore* bulls

Guilherme Rizzoto[1]
guilhermerizzoto@hotmail.com
Henry David Mogollon Garcia[1]
Antônio Guilherme Roncado Pupulim[1]
Eduardo dos Santos Rossi[1]
João Carlos Pinheiro Ferreira[1]

Abstract: Temperature of testes must be between 3-5ºC below body core, for proper testicular function. A long-standing dogma stated that testes functions under low oxygen concentrations and as testicular temperature increases, no change in testicular blood flow is observed, leading, therefore, to testicular hypoxia. Importantly, recent data developed by the author, presented important challenges to this dogma, indicating that temperature itself was the most important pathological agent in reproductive impairment post heat stress. Using novel approaches, we mapped important gene modulations after heat stress in Nelore bulls. It was observed that the patological impact was led by genes associated to *P53*-dependent apoptotic pathway (BCL-2), as well as the temptive defense mechanisms within the testes were spear-headed by genes related to antioxidant (*GPX1*) and chaperone (Hsp70) systems. Furthermore, reduced levels of StAR gene were observed, indicating impact in steroidogenesis. These findings will serve as a strong base for new studies in this area.

Keywords: Heat stress; testes; spermatogenesis.

Palavras-chave: Estresse-térmico; Testículos; Espermatogênese.

Introduction - Temperature of the testes must be between 3-5 ºC below body core, for proper testicular function [1;2]. Consequently, after testicular heat stress, bulls present reduced sperm quality [3]. *Bos indicus* breeds such as the Nelore, are valuable assets in food production, particularly in tropical environments, since the animlas are more adopted to warmer climates when compared to *Bos taurus* animals [4-6]. However, when exposed to high ambient temperatures, Nelore bulls also suffer an impact on reproductive performance, impairing sperm quality and testosterone production [7]. In addition, pathophysiological mechanisms of heat stress impact on testicular function in cattle are not well described in the literature. Interestingly, modulations in genes and proteins in response to testicular hyperthermia have been suggested [8]. For example, it was hypothesized that the P53 gene was increased, leading to the activation of the P53-related intrinsic and extrinsic apoptotic pathways [9]. The P53 gene, acts upon BCL- 2, leading to apoptosis through activation

[1] Department of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

*CASP*ases 8, 9 and 10. Furthermore, there are the indication of possible defense mechanisms, related to antioxidative and chaperone systems. However, these genes have been studied only in laboratory animals, but not in Nelore bulls. Our objective was to map the activity of candidate genes in the defense and pathological specters of acute testicular heat stress in testes of Nelore bulls.

Material and methods – Healthy adult Nelore` bulls (N=20), were used. All animal activities were approved by an institutional committee (Unesp-Botucatu - Protocol 029/2018). To induce acute testicular heat stress, disposable diapers were used as insulation material of the scrotum, causing testicular hyperthermia. Four groups (n=5/group) were organized: non-insulated (control) and insulation removed after 12, 24, or 48h. At the end of insulation period, diapers were removed and a needle thermocouple used to measure intratesticular temperature, as described (Rizzoto *et al.*, 2020). Then, bulls were castrated, and testicular tissue was collected, and stored in LN2. To study gene expression, total RNA was extracted with Trizol® (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and submitted to reverse transcription using random primers, in accordance with manufacturer's instructions (High Capacity Kit, Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Four gene targets were selected (BCL-2, StAR, GPX1, HSP70) and subjected to RT-qPCR analyzes (QuantStudio™ 7 Flex - Power Sybr Green® - Applied Biosystems®) using specific primers for each gene of interest. Samples were analyzed in duplicate and as negative control; water was added to the mix in lieu of cDNA (in each plate). PPIA (isomeryl peptidylprolyl isomerase A) was used as housekeeping gene. Lastly, to quantify relative expression, the ΔΔCt method (target genes / PPIA) was used, with correction of efficiency for each target gene. Differences among groups were evaluated by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Data presented as mean ± SEM. Differences were considered significant when P≤0.05.

Results and discussion- Testicular insulation increased intratesticular temperature from 24 h onwards, peaking at 48h (Fig.1).

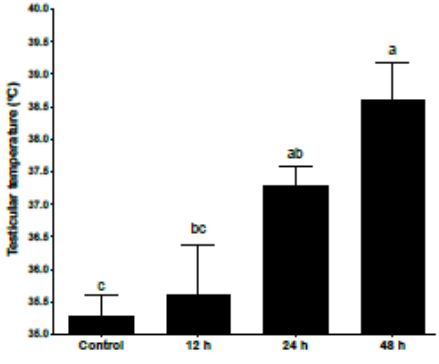


Figure 1) Mean (± SEM) intratesticular temperature (°C) in Nelore bulls after insulation for 12 to 48h. [a-c]Columns without a common superscript differed (P<0.05).

There were marked changes in mRNA abundance for all 4 target genes (Fig 2. (A) Down-regulation of StAR, starting at 12 h, more evident at 24-48 h. (B) BCL2 presented a single decrease point at 24h (P<0.05), rebouncing to Control values afterwards. (C) GPX1 had roughly 70% increase at 48 h (P<0.05). (D) HSP70 had a 34X increase (P<0.05) at 12 h, followed further increases (P<0.05) at 24 and 48 h when compared to control.

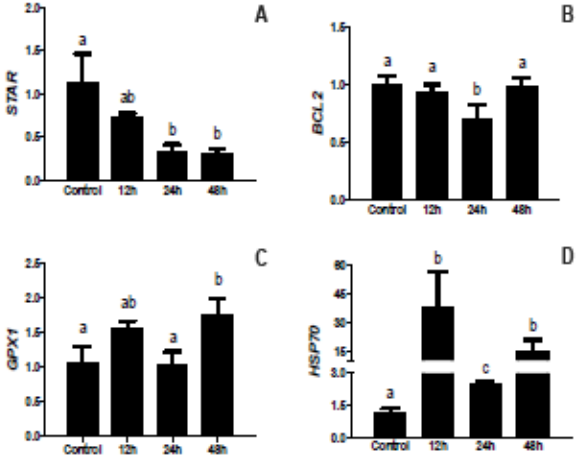


Figure 2) Impact of heat stress on gene expression of candidate genes in testes of Nelore bulls at 12, 24 and 48h post-insulation, Control group was composed of non-insulated animals. [a-c]Within a row, means with a different superscript differed (P<0.05).

An increase of ~3 ºC of testicular temperature was observed after 48h of insulation (P<0.05), corroborating with previous findings [1]. An increase of this magnitude, even of short duration, alters spermatogenesis and reduces sperm quality in various species [11;12]. Interestingly, Leydig cells are particularly impacted by heat stress, which is indicated in our study by the downregulation of *StAR* gene at 12 h, since *StAR* is fundamental for testosterone production in Leydig cells, therefore, its reduction is a mirror of the impact on such cellular population.

Furthermore, in the present study, increased testicular antioxidative capability was identified within the observations performed, namely *GPX1*, after 12 h of insulation, with a markedly increase at 48 h. Similarly, in rams, scrotal insulation for 240 h, increased testicular temperature 5 ºC and enhanced immunolocalization of *GPX1* in testes, with a broader range of cell types than other antioxidant enzymes [12]. Glutathione peroxidase is important to prevent lipid peroxidation in sperm [13]. Based on the above indicated, is clear that that GPX 1 is a key antioxidant agent protecting testicular cells against heat stress. Another fundamental defense mechanism within testes is expression of chaperone genes and proteins, namely Heat Shock Proteins (HSPs) [9].

In our study HSP70, one of the most important HSPs, went through a profound up-regulation of from 12 h onwards (P<0.05). Lastly, an agent such as the BCL-2 gene, is an

important component of the P53-dependent apoptotic pathway [9]. Reduction on BCL-2 promotes cell death through apoptosis, initiating effects of apical *CASP*ases such as *CASP*ase 8, for example, and completion through other *CASP*ases, so-called effectors [9]. In our study, the decrease observed at 24 h is an important indicator of activation and ongoing activity of the pathophysiology derived from the apoptotic cascade. In conclusion, the heat stress derived from the insulation of the testis allowed us to map important mechanisms involved in the pathway through which: 1) Nelore bulls responded to heat stress, i.e. increased expression of antioxidant molecules (*GPX1*) and increased production of chaperones (*HSP*70); and 2) how heat stress damaged testicular cells, including down regulation of *StAR* and BCL-2, fundamental for spermatogenesis and sperm quality and anti-apoptotic activity, respectively. These findings will serve as a strong base for new studies in this area.

Referências bibliográficas

[1] Kastelic, J. P.; Coulter, G. H.; Cook, R. B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology* 1995;44:147–152.

[2] Freeman, S. The evolution of the scrotum: A new hypothesis. *J Theor Biol* 1990;145:429-45.

[3] Fernandes, C. E.; Dode, M. A. N.; Pereira, D.; Silva, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with *in vitro* fertilizing ability. *Theriogenology* 2008;70:1560-8.

[4] Beatty, D. T.; Barnes, A.; Taylor, E.; Pethick, D.; McCarthy, M.; Maloney, S. K. Physiological responses of Bos taurus and Bos indicus cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *Journal of Animal Science* 2006;84:972-85.

[5] Hansen, P. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science* 2004;82–83:349–60.

[6] Skinner, J. D.; Louw, G. N. Heat stress and spermatogenesis in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Journal of Applied Physiology* 1966;21:1784-90.

[7] Nichi, M.; Bols, P. E. J.; Züge, R. M.; Barnabe, V. H.; Goovaerts, I. G. F.; Barnabe, R. C.; Cortada, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 2006;66:822-8.

[8] Misztal, I. Breeding and Genetics Symposium: Resilience and lessons from studies in genetics of heat stress. *Journal of Animal Science* 2017;95:1780-7.

[9] Durairajanayagam, D.; Agarwal, A.; Ong, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reproductive Biomedicine Online* 2015;30:14–27.

[10] Rizzoto, G.; Ferreira, J. C. P.; Mogollón Garcia, H. D.; Teixeira-Neto, F. J.; Bardella, L. C.; Martins, C. L.; Silva, J. R. B.; Thundathil, J. C.; Kastelic, J. P. Short-term testicular warming under anesthesia causes similar increases in testicular blood flow in *Bos taurus* versus *Bos indicus* bulls, but no apparent hypoxia. *Theriogenology* 2020;145:94–9.

[11] Wechalekar, H.; Setchell, B. P.; Breed, W. G.; Ricci, M.; Leigh, C.; Peirce, E. Whole body heat stress induces selective germ cell apoptosis in mice. *Reproduction Fertility and Development* 2008;20:117.

[12] Hamilton, T. R. D. S.; Duarte, G. E.; Visintin, J. A.; Assumpção, M. E. O. D. Immunolocalization of antioxidant enzymes in testis of rams submitted to long-term heat stress. *Zygote* 2019;27:432–5.

[13] Kankofer, M.; Kolm, G.; Aurich, J.; Aurich, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 C. *Theriogenology* 2005;63:1354–65.

Acknowledgements: Financial support from FAPESP (Grant#2018/02007-6), is gratefully acknowledged.

É possível detectar DNA de *Trypanosoma vivax* no sêmen de caprinos jovens infectados experimentalmente?

Lindsay Unno Gimenes[1]
lindsay.gimenes@unesp.br
Amanda Kassem Samour[1]
Beatriz Eustachio Boarini[1]
Gwennever Camargo Moraes[1]
Letícia Reis Manólio[1]
Maísa Panzani Santos[1]
Sarah Daccach[1]
Viviane Bobadilha Morelli[1]
Alessandra Regina Carrer[1]
Letícia de Castro Fiori[1]
Kayo José Garcia de Almeida Castilho Neto[1]
Guilherme Fazan Rossi[1]
Claudia Cristina Paro de Paz[2]
Marcos Rogério André[1]
Rosangela Zacarias Machado[1]

Abstract: The aim in the present study was to verify the possibility of identifying *T. vivax* DNA, by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique, in the semen of young goats experimentally infected. Serial semen samples (D-3, D6, D13, D20, D27, D34 and D41) were collected from 13 Saanen goats, being D0 the day of experimental inoculation of 1 mL of blood containing 1 x 10^4 trypomastigotes of *T. vivax* (Miranda strain). The DNA of the samples was extracted and submitted, in duplicate, to LAMP. Data were submitted to logistic regression. The detection of *T. vivax* DNA by LAMP in the semen of young goats was confirmed. Six animals were positive in at least one time of observation, with continuous elimination in two of them from D6 or D13 to D34. In conclusion, identification of *T. vivax* DNA by LAMP in semen from experimentally infected young goats is possible.

Keywords: tripanosomiasis; LAMP; ejaculate.

Palavras-chave: tripanossomíase; LAMP; ejaculado.

Introdução – As infecções por *Trypanosoma vivax* acometem um grande número de espécies unguladas domésticas e silvestres, sendo responsáveis por grandes perdas econômicas, com

[1] Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

[2] Centro de Pesquisa de Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios.

elevada mortalidade de animais de produção no Brasil. Afecções reprodutivas ocasionadas por *T. vivax* em machos foram descritas de forma escassa na espécie bovina [1; 2] e em pequenos ruminantes [3; 4].

Apesar dos impactos na produção e reprodução, ainda não há muitas informações disponíveis sobre os efeitos deste agente parasitário no trato reprodutivo na espécie caprina, havendo apenas um relato das alterações microscópicas testiculares realizado na década de 80 [3] e, mais recentemente, demonstrou-se a eliminação de DNA do agente no sêmen de caprinos experimentalmente infectados, pela técnica de PCR [5].

Para diagnóstico, a PCR é uma técnica molecular capaz de detectar entre 10 a 1000 parasitas por mililitro de sangue, porém, outra ferramenta ainda mais sensível é a *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), cujo limite de detecção é de um parasita por mililitro de sangue [6]. Portanto, o objetivo no presente estudo foi verificar a possibilidade de identificar DNA de *T. vivax,* pela técnica de LAMP, no sêmen de caprinos jovens após infecção experimental.

Material e Métodos – Foram colhidas amostras seriadas de sêmen pelo método de vagina artificial (D-3, D6, D13, D20, D27, D34 e D41) de 13 caprinos da raça Saanen, com idade entre 6 e 9 meses, infectados com 1 mL de sangue contendo 1 x 10^4 tripomastigotas da cepa Miranda de *T. vivax.* O dia da inoculação foi considerado o D0. As amostras foram armazenadas em microtubos de centrífuga de 200 µL e mantidas a – 80ºC até o processamento.

A extração de DNA do sêmen dos animais foi realizada utilizando o kit ReliaPrep® Blood gDNA Miniprep system (Promega, Madison, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Para verificar eventual contaminação das amostras, em cada bateria de extração acrescentou-se água ultrapura autoclavada DNAse e RNAse free (Invitrogen, Carlsbad, EUA), denominada de controles da extração. O DNA extraído de cada amostra foi submetido à análise por espectrofotometria (Nanodrop 2000®, Thermo Fisher Scientific, Whaltam, EUA), obtendo-se as concentrações e relações 260/280 e 260/230.

Para verificação da qualidade do DNA obtido e a presença de inibidores, todas as amostras e controles da extração foram submetidos à PCR para o gene endógeno GAPDH, codificador da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, conforme metodologia descrita por [7], utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (GAPDH F [5´CCTTCATTGACCTCAACTACAT3´] e GAPDH R [5´CCAAAGTTGTCATGGATGACC3´], IDT®, USA).

A técnica de LAMP foi a mesma descrita por [8], porém para o diagnóstico de *T. vivax* no sêmen. Foi utilizado um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam um fragmento de 125 pares de bases da sequência do DNA satélite do *T. vivax* (GenBank: J03989), conforme descrito por [6]. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram: oligonucleotídeos iniciadores externos (F3 [5´TGTTCTGGTGGCCTGTTGC3´] e B3 [5´GGCCGGAGCGAGAGGTGC3´]), oligonucleotídeos iniciadores internos (FIP [5´GTGGAGCGTGCCAACGTGGACCCGCTCCCAGACCATA3´] e BIP [5´ TGTCTAGC GTGACGCGATGGAAGAGGGAGTGGGGAAGG3´]) e oligonucleotídeos iniciadores circulares (LF [5´CACATGGAGCATCAGGAC3´] e LB [5´ CCGTGCACTGTCCCGCAC3´].

Todas as reações foram conduzidas em duplicata, acompanhadas de água ultrapura como controle negativo e DNA do isolado Lins de *T. vivax* [9] como controle positivo. Quando algumas amostras não se mostraram consistentes quando analisadas em duplicata, foram refeitas em triplicata. As reações foram conduzidas em termociclador de PCR em tempo real CFX96 (BioRad, USA) a 63°C por 60 minutos. Por fim, elevou-se a temperatura para 80°C por 5 minutos e a curva de dissociação foi realizada variando a temperatura de 63 a 96ºC com incrementos de 0,5ºC a cada 5 segundos. Somente as amostras que apresentaram variação de ± 0,5ºC na temperatura de melting (Tm), quando comparadas à Tm do controle positivo, foram consideradas positivas.

Os dados foram submetidos à análise de regressão logística (PROC GENMOD, SAS), incluindo o efeito fixo de momento de avaliação e repetição como covariável. As médias foram comparadas por Tukey e considerou-se significância valores de P ≤0,05.

Resultados e Discussão – Todas as amostras foram positivas para o gene GAPDH. A detecção de DNA de *T. vivax* no sêmen de caprinos jovens pela técnica de LAMP foi confirmada. Um total de 6 entre os 13 animais experimentais apresentaram-se positivos na LAMP em pelo menos um momento de observação, sendo dois animais detectados apenas no D13, dois apenas no D20, um do D6 ao D34 e um do D13 ao D34. Não houve diferença no percentual de animais positivos para LAMP ao longo do tempo (Figura 1).

O resultado do presente trabalho confirma os achados de [5], também em caprinos. A importância deste fato reside na possibilidade de transmissão do agente pela via sexual, reconhecida para outros tipos de tripanossoma, como *T. equiperdum* - inclusive por inseminação artificial - e *T. cruzi*, e aventada para *T. vivax* [5], embora ainda não comprovada [10].

Contudo, há uma importante diferença entre estes dois estudos - a técnica molecular empregada para a detecção de DNA de *T. vivax* (PCR *versus* LAMP). A maior sensibilidade da LAMP em relação à PCR já havia sido previamente documentada, o que implica em diferenças no limite de detecção do material genético na amostra (equivalente a 1 parasita/ mL *versus* 400 parasitas/ mL, respectivamente) [6]. Tendo em vista que há flutuações de parasitemia durante infecções naturais ou experimentais e, portanto, da eliminação de *T. vivax* no sêmen, o uso de uma técnica mais sensível como a LAMP é desejável e deve ser levada em consideração na realização de levantamentos epidemiológicos.

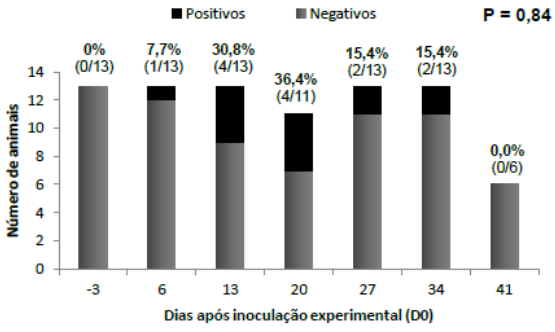


Figura 1. Percentual de caprinos jovens com diagnóstico positivo para detecção de DNA de *T. vivax* no sêmen, pela técnica de LAMP

Considerações Finais – É possível identificar DNA de *Trypanosoma vivax*, pela técnica de LAMP, em sêmen de caprinos jovens experimentalmente infectados.

Referências bibliográficas

[1] Adamu, S.; Fatihu, M. Y.; Useh, N. M.; Mamman, M.; Sekoni, V. O.; Esievo, K. A. Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma* vivax. *Vet Parasit* 2007; 143:29-34.

[2] Sekoni, V. O.; Njoku, C. O.; Kumi-diaka, J.; Saror, D. I. Pathological changes in male genital cattle infected with *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense*. *Br Vet J* 1990; 146:175-180.

[3] Anosa, V. O.; Isoun, T. T. Further observations on the testicular pathology in *Trypanosoma vivax* infection of sheep and goats. *Res Vet Sci* 1980; 28:151-160.

[4] Bezerra, F. S. B.; Garcia, H. A.; Alves, H. M.; Oliveira, I. R. S.; Silva, A. E.; Teixeira, M. M. G.; Batista, J. S. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2008; 28:575-582.

[5] Bezerra, N. M.; Moura, G. H. F.; Araújo, H. N.; Bezerra, F. S. B.; Paiva, K. A. R.; Costa, K. M. F. M.; Costa, W. P.; Medeiros, D. A. S.; Batista, J. S. Detection of *Trypanosoma vivax* DNA in semen from experimentally infected goats. *Vet Res Commun* 2018; 42:131-135.

[6] Njiru, Z. K.; Ouma, J. O.; Bateta, R.; Njeru, S. E.; Ndungu, K.; Gitonga, P. K.; Guya, S.; Traub, R. Loop- mediated isothermal amplification test for *Trypanosoma vivax* based on satellite repeat DNA. *Vet Parasit* 2011; 180:358-362.

[7] Birkenheuer, A. J.; Levy, M. G.; Breitschwerdt, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine bood samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4172-4177.

[8] Sampaio, P. H. Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *Trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal – SP 2017.

[9] Cadioli, F. A.; Barnabé, P. A.; Machado, R. Z.; Teixeira, M. C. A.; André, M. R.; Sampaio, P. H.; Fidélis Junior, O. L.; Teixeira, M. M. G.; Marques, L. C. Primeiro relato de surto por *Trypanosoma vivax* em vacas leiteiras no estado de São Paulo. *Rev Bras Parasitol* 2012; 21:118-124.

[10] Bezerra, N. M. Vias alternativas de transmissão do *Trypanosoma vivax* em caprinos infectados experimentalmente. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – RN 2017.

Agradecimentos: À FAPESP pelo Auxílio à Pesquisa (PROC: 2019/22695-7) e Bolsas de Iniciação Científica (2020/06492-0, 2020/06493-2 e 2020/07152-4).

Inter-relações entre as características qualitativas dos espermatozoides em bovinos

Teresinha Inês de Assumpção[1]
teassumpcao@ufu.br
Neimar Correa Severo[2]
João Pedro Brandão Zandonaide[3]
Gustavo Guerino Macedo[4]

Abstract: The aim was to analyze the interrelationship between the qualitative characteristics of the semen. Semen samples from cattle, collected by artificial vagina, were analyzed as follows: Total and progressive motility by computerized semen analysis; sperm morphology assessed in a wet chamber under phase contrast microscopy; supravital test with smear stained by eosin- nigrosine; plasma membrane integrity with SYBR-14 / IP and mitochondrial potential with JC-1 whith by flow cytometry. Correlations were analyzed using Pearson's test ($p < 0.05$). There were correlations between the various characteristics analyzed, notably among those that reflect cell viability, such as motility, number of living cells, membrane integrity and sperm abnormalities. These observations show that it is very important to analyze the associations between the seminal parameters, as it demonstrates which of them correlate and how they influence each other, which reinforces the importance of analyzing several parameters in the evaluation of the quality of a semen sample.

Keywords: *semen; fertility; morphology.*

Palavras-chave: *sêmen; fertilidade; morfologia.*

Introdução - A qualidade do sêmen é um dos fatores que limita o aumento nos índices de fertilidade *in vivo* e *in vitro*, pois a fertilidade envolve um processo complexo e requer muitos atributos da célula espermática para que ela possa atingir o local de fertilização, penetrar o oócito e ativar o desenvolvimento do embrião [1]. O espermatozoide é uma célula altamente especializada responsável por levar DNA do macho até o óvulo, sendo que para o sucesso da concepção são necessárias membranas, organelas e genoma intactos, com as estruturas básicas de cabeça, peça intermediária e cauda sem alterações [2]. Para acessar a fertilidade do macho, nenhum teste isolado é capaz de predizer o potencial da amostra de sêmen, sendo que os diferentes testes utilizados são baseados na motilidade, morfologia, viabilidade, ultraestrutura e organelas celulares [3]. Este estudo visou analisar a correlação existente as características qualitativas do sêmen e sua inter-relação.

[1] Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
[2] RevivaH Consultoria Técnica, Uberaba, MG.
[3] Alta Genetics, Uberaba, MG
[4] Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Material e Métodos - Foram utilizadas no estudo 105 amostras de sêmen de bovinos da raça Nelore, coletadas por vagina artificial em uma central de coleta e processamento de sêmen. Foram realizadas as seguintes análises nas amostras: Motilidade total e progressiva pela análise computadorizada de sêmen (CASA) em equipamento modelo IVOS (Hamilton Thorne®); morfologia espermática avaliada em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase [4]; teste supravital com esfregaço de sêmen corado por eosina-nigrosina (corante Botuvital®, Botupharma, Botucatu, SP), verificando a porcentagem de vivos e mortos [5]. A integridade da membrana plasmática foi avaliada com iodeto de propídio/ SYBR-14 e o potencial mitocondrial com JC-1, ambos analisados por citometria de fluxo [6], com adaptações. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Statistical Analysis System for Windows SAS®. As correlações foram avaliadas pelo teste de Pearson. Foi considerada como diferença significativa entre as variáveis testadas $p<0,05$.

Resultados e Discussão - Os resultados mostram correlações entre as diversas variáveis analisadas, porém apenas algumas delas foram significativas e estão apresentadas na tabela 1, sendo que algumas variáveis apresentam correlação positiva e outras negativas.

Tabela 1 – Correlações entre motilidade do sêmen, anormalidades dos espermatozoides, integridade de membrana e potencial mitocondrial e o número de células vivas observadas nas amostras de sêmen de touros da raça Nelore ($p<0,05$).

	GCP	CA	CIN	PF	DEL	AB/RET	DB	MOT T	MOT P	VIVOS	INT MEM	MITO	DEF TOT	DEF MAI	DEF MEN	DEF CAB	DEF CAU
AC										-0.23			0.29	0.34		0.56	
CE															0.27		
CD			0.30										0.42		0.73		0.51
CFDE	0.27	0.30				0.21	0.19			-0.35		-0.40	0.57	0.55	0.20		0.58
GCP				-0.24									0.46	0.69			0.59
GCD												-0.38			0.30		0.22
CA								-0.35	-0.25	-0.30	-0.20	-0.47	0.30	0.41		0.42	
CIN								0.31	0.21				0.49		0.66		0.54
PF					0.73											0.56	-0.23
PIR					0.22										0.23	0.24	
DEL							0.57		0.23		0.23					0.51	
PI														0.24			
AB/RET							0.39						0.26		0.24		0.23
DB									0.25				0.26			0.32	
MOT T									0.95	0.43	0.82	0.45					
MOT P										0.44	0.73	0.46					
VIVOS											0.53	0.66	-0.30	-0.37		-0.23	
INT MEM												0.470					
MITO													-0.37	-0.39		-0.36	
DEFTOT														0.75	0.60	0.43	0.85
DEFMAI																0.49	0.53
DEFMEN																	0.66

AC - acrosoma, CE - cauda enrolada, CD - cauda dobrada, CFDE - cauda fortemente dobrada ou enrolada, GCP - gota citoplasmática proximal, GCD - gota citoplasmática distal, CA - contorno anormal, CIN - cabeça isolada normal, PF – pouch formation, PIR - piriforme, DEL - cabeça delgada, PI - defeitos de peça intermediária, AB/RET– abaxial/ retroaxial, DB – delgado na base, MOT T – motilidade total, MOT P – motilidade progressiva, VIG – vigor, CON – concentração, INT MEM – integridade de membrana, MITO – potencial mitocondrial, DEF TOT – defeitos totais, DEF MAI – defeitos maiores, DEF MEN – defeitos menores, DEF CAB – defeito de cabeça, DEF CAU – defeito de cauda.

Entre as correlações positivas vale destacar: integridade de membrana x potencial mitocondrial, pois danos na membrana celular podem também ocasionar danos à mitocôndria prejudicando o potencial mitocondrial. Integridade de membrana x motilidade total e progressiva, já que células que tem membrana íntegra tem maior chance de estarem vivas e serem móveis. Vivos x integridade de membrana, potencial mitocondrial, motilidade total e progressiva, pois só estarão vivas as células que estejam com sua estrutura íntegra e se movimentando. Entre as correlações negativas destacamos: potencial mitocondrial x vivos, pois subpopulações de espermatozoides com problemas de mitocôndrias têm vida mais curta. Cauda fortemente dobrada ou enrolada x vivos e potencial mitocondrial, pois estas células têm maior chance de morrerem devido a falta de movimentação. Contorno anormal x motilidade total e progressiva, vivos, potencial mitocondrial e integridade de membrana, já que este defeito estrutural da célula fará com que tenha menor probabilidade de estar viva e com sua membrana sem alteração. Vivos x defeitos maiores, menores e de cabeça, pois aquelas células com maior número de defeitos terão sua chance de morrer bem mais elevada que as normais. Estas observações mostram que é muito importante analisar as associações entre os parâmetros seminais, pois demonstra quais deles se correlacionam e como se influenciam mutuamente, o mesmo concluído por Fonseca [7]. Não foram encontradas neste estudo correlações significativas entre a motilidade e as anormalidades espermáticas, semelhante ao verificado por Pastore [8], apesar de outros estudos terem verificados uma correlação negativa entre estas características [7, 9, 10]. Porém vale registrar as correlações positivas entre motilidade, número de células vivas e integridade de membrana, mostrando assim a importância da integridade celular para que ela tenha sua motilidade garantida, corroborando assim com os achados de Panmei [3].

Considerações Finais – As correlações observadas entre motilidade do sêmen, anormalidades dos espermatozoides e viabilidade celular nos infere que qualquer alteração em uma das características do espermatozoide afetaria diretamente o processo de fecundação levando a redução da fertilidade, pois elas se relacionam e/ou se influenciam, reforçando a importância da análise de vários parâmetros para a avaliação da qualidade de uma amostra de sêmen.

Referências bibliográficas

[1] Aitken, R. J.; Henkel, R. R. Sperm cell biology: current perspectives and future Prospects. *Asian Journal Andrology* 2011; 13: 3-5.

[2] Silva, P. F. N.; Gadella, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 2006; 65: 958–978.

[3] Panmei, A.; Gupta, A. K.; Shivahre, P. R.; Bhakat, M.; Upadhyay, A. Conventional and fluorescent based semen quality assessment in Karan Fries bulls. *Veterinary World* 2015; 8 (10):1243-1246.

[4] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3. ed. Belo Horizonte; 2013.

[5] Faezah, S. M.; Zuraina, F. M. Y.; Farah, J. H. F.; Khairul, O.; Hilwani, N. I.; Iswadi, M. I.; Fang, C. N.; Zawawi, I.; Abas, O. M.; Fatimah, S. I. The effects of magnetic separation on cryopreserved bovine spermatozoa motility, viability and cryo-capacitation status. *Zygote* 2012; 22: 378–386.

[6] Celeghini, E. C. C.; Arruda, R. P.; Andrade, A. F. C.; Nascimento, J.; Raphael, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reproduction Domestic Animals* 2007; 42: 479-488.

[7] Fonseca, V. O. Avaliação reprodutiva de touros para monta a campo: análise crítica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2009; 6(supl): 36-41.

[8] Pastore, A. A.; Toniollo, G. H.; Lobo, R. B.; Fernandes, M. B.; Vozzi, P. A.; Vila, R. A.; Galerani, M. A. V.; Elias, F. P.; Cardilli, D. J. Características biométricas, testiculares, seminais e parâmetros genéticos de touros pertencentes ao programa de melhoramento genético da raça Nelore. *ARS Veterinária*, 2008; 24(2): 134-141.

[9] Oliveira, L. Z.; Oliveira, C. S.; Monteiro, F. M.; Lima, V. F. M. H.; Lima, F. M.; Costa, M. Z. Efeito da idade sobre as principais características andrológicas de touros Brangus-Ibagé criados extensivamente no estado do Mato Grosso do Sul – Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae* 2011; 39 (1): 946-953.

[10] Assumpção, T. I.; Souza, M. A.; Alberton, C.; Pallaoro, R.; Kitagawa, C.; Silva, N. A. M. Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias* 2013; 20 (3): 148-154.

Ultrassonografia testicular identifica touros Nelore superprecoces?

Fernanda Battistotti Barbosa[1, 2]
fernandabattistotti@hotmail.com
Luiz Carlos Cesar da Costa Filho[2]
Alini Silva Peixoto[2]
Aline Gomes da Silva[3]
Gustavo Guerino Macedo[3]
Eliane Vianna da Costa e Silva[3*]
eliane.silva@ufms.br
*Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul, GERA- MS/CNPq

Abstract: The aim of this study was to evaluate the sexual precocity of male bovine animals, in order to determine the viability and reliability of this characteristic, measured by testicular ultrasound, to identify male sexual precocity. It was evaluated 5,075 Nellore bulls in 2016 and 2017, during birth seasons of 14 farms. They were submitted to weighing, testicular circumference (SC), testicular ultrasound (US) and perform semen collection. The animals were classified into four groups: early maturing (EM, puberty up to 14 months), typical maturing (puberty between 14 to 17 m), late precocity (over 17 m) and no maturing (who did not obtained puberty). The probability to identify EM based only in the testicular echogenicity was greater than 80% at 7–12 m.o. The US is an effective method to identify sexually precocious animals in this age, allowing higher selection pressure, decreasing the interval between generations, accelerating genetic progress.

Keywords: puberty; scrotal circumference; ultrasound.

Palavras-chave: perímetro escrotal, puberdade, ultrassonografia.

Introdução - As características reprodutivas são de grande importância na produção e melhoramento genético de bovinos. Dentre elas, a precocidade sexual é a característica que apresenta maior possibilidade de alteração, além de alto impacto econômico sobre sistema de criação [1]. A seleção de animais sexualmente mais precoces, torna o ciclo de produção mais curto, aumenta a permanência de fêmeas no rebanho, amortiza custos de mantença dos animais, diminui o intervalo entre gerações, e contribui para que o progresso genético ocorra de forma mais rápida e eficaz [2]. Muitos estudos demonstram que através da ultrassonografia testicular é possível diferenciar animais em estágios diferentes de desenvolvimento, identificando animais que estão púberes ou não [3,4,5]. Entretanto, não se sabe ainda, se a

[1] Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS.

[2] Médicos Veterinários, Procriar Assistência Zootécnica e Veterinária.

[3] Laboratório de Reprodução Animal, FAMEZ/UFMS, Campo Grande/MS, Brasil.

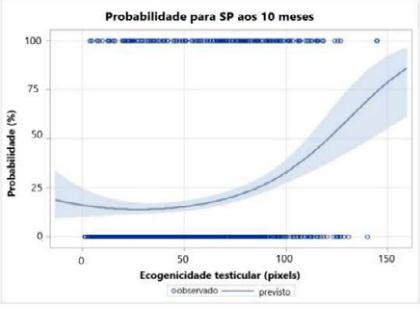
ultrassonografia testicular é um bom indicativo de precocidade sexual em bovinos, podendo ser utilizada como critério de seleção. O presente estudo avaliou a precocidade sexual de machos da raça Nelore, utilizando a ultrassonografia testicular, a fim de determinar se o método é eficaz em identificar precocidade.

Material e Métodos - Participaram das avaliações 5.075 bovinos machos da raça Nelore, oriundos de duas safras de nascimento, de 14 propriedades rurais, inicialmente entre 7 a 13 meses, após desmama, avaliados a cada 90 dias por um ano (quatro avaliações/safra), coincidindo com as pesagens corporais oficiais de programas de melhoramento genético. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, protocolo nº 118/2006. Realizou-se mensuração do perímetro escrotal (PE), ajustada para 365 (PE365) e 450 dias (PE450) e tentativas de coleta seminal por eletroejaculação a partir de 19 cm de PE. A análise seminal dos aspectos físicos seguiu o preconizado por [6]. Amostras contendo 20µl de sêmen misturado à 1 ml de formol salina 10%, foram feitas dos machos que apresentaram no mínimo 10% de motilidade total para determinação da concentração espermática através do fotômetro AccuRead®. Considerou-se púberes, os animais que apresentaram motilidade ≥ 10% e no mínimo 50 milhões de espermatozoides totais no ejaculado [7]. Utilizou-se ultrassom portátil Mindray DP-2200vet, com uma probe linear de 7,0 MHz para captura da imagem testicular no plano latero-medial direito. A ecogenicidade testicular foi determinada por média de pixels da imagem ultrassonográfica lida através do programa de computador *Image J*. Após as análises, os tourinhos foram classificados de acordo com a idade à puberdade em: superprecoces (SP – púberes até 14 meses), precoces (P – púberes entre 14 e 17 meses) e tradicionais (Trd –acima de 17 meses), e, aqueles que até o fim das avaliações não entraram em puberdade, tardios (T). A partir da classificação dos animais registrou-se de forma binomial a probabilidade do animal ser superprecoce – SP, que foi avaliada por análise de regressão logística incluindo-se no modelo os efeitos fixos de ecogenecidade testicular nas diferentes faixas etárias, fazenda, safra, PE365, PESO365, PE450 e PESO450, considerou-se o nível de significância em 5%. Utilizou-se o programa SAS® University Edition

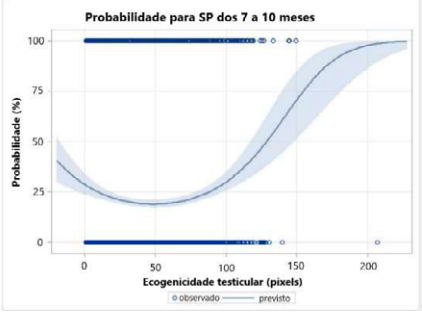
Resultados e Discussão - O modelo de regressão logística explicou 85,8% da probabilidade de um animal ser superprecoce (SP) através da medida de ecogenicidade testicular aos 10 meses de idade, considerando os efeitos significativos de safra, fazenda, PE450 e PESO450 ($p<0,0001$), como demonstrado na Fig. 1. Contudo, a avaliação aos 10 meses de idade se torna inviável para as fazendas na prática, pelo excesso de manejo com os animais, descaracterizando inclusive os grupos contemporâneos pois determinaria manejos individuais. Portanto, testou-se a probabilidade de se identificar precocidade sexual através da ultrassonografia testicular trabalhando com animais dentro de faixas etárias correspondentes aos grupos de manejo: entre 7 e 10 meses de idade e dos 7 aos 12 meses de idade representados nas Fig. 2 e 3, respectivamente. O modelo de regressão logística que avaliou a probabilidade de determinação do indivíduo ser SP utilizando a ecogenecidade testicular obtida na faixa etária entre 7 e 10 meses, apresentou 83,3% de concordância e incluiu safra, fazenda, PE450 e

PESO365 (p<0,0001). Observa-se na Fig.3 que há um intervalo de confiança alto. Ao avaliar o mesmo modelo, considerando uma faixa etária maior (7 aos 12 meses de idade) de medida da ecogenicidade testicular, observou-se 84,4% de probabilidade de ser (SP), e efeitos significativos de pixels*pixels (p=0,0014), safra, fazenda PE450, PESO365 (p<0.0001), Fig.3. As Fig. 2 e 3 mostram que a ecogenicidade próxima dos 200 pixels apresenta alta probabilidade de identificação do animal superprecoce, sendo que o intervalo de confiança é mais estreito, o que torna a medida mais confiável quando se adota a faixa etária entre 7 e 12 meses (Fig.3). Os estudos realizados até o momento utilizando a Ultrassonografia testicular como recurso de identificação da precocidade o fizeram com animais mais velhos. Brito *et al.* [3] não a entenderam como um bom preditor de precocidade sexual em Nelore, quando comparados em duas classes de precocidade 527 vs 673 dias, portanto se comparado às classes que este experimento se propôs, seriam todos tradicionais ou tardios. Rodrigues *et al.* [4] afirmaram que a ultrassonografia testicular não é uma técnica eficaz para avaliação do desenvolvimento testicular em bovinos. Entretanto, no presente estudo, a ultrassonografia testicular demonstrou-se boa ferramenta de avaliação de desenvolvimento testicular e ainda, uma técnica eficaz em identificar animais pertencentes a classes de precocidade distintas na mesma faixa etária da primeira medida zootécnica adotada pelos Programas de Melhoramento Genético. Esses resultados tornam a ultrassonografia testicular um método interessante e promissor na distinção de animais superprecoces dos precoces, principalmente pela facilidade de aplicação da técnica à campo.

Considerações Finais – A faixa etária entre 7-12 meses deve ser o período no qual a avaliação para precocidade sexual por meio da ultrassonografia testicular deve ser realizada, pela alta probabilidade de distinguir os animais superprecoces do rebanho.



1



2

Figura 1. Probabilidade de identificar touros Nelore superprecoce (SP) através da ecogenicidade testicular medida aos 10 meses de idade.

Figura 2. Probabilidade de identificar touros Nelore superprecoce (SP) dos 7 aos 10 meses através da ecogenicidade testicular medida aos 10 meses de idade.

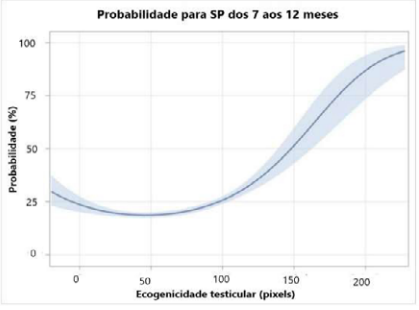


Figura 3. Probabilidade de identificar touros Nelore superprecoce (SP) dos 7 aos 12 meses através da ecogenicidade testicular medida aos 10 meses de idade.

Referências bibliográficas

[1] Fries, L. A. Critérios de seleção para um sistema de produção de ciclo curto. Seminário: Avaliação Funcional de Bovinos de Corte e Formação do Corpo de Jurados Raça Angus. 2004; Esteio, Sumário 74-88.

[2] Silveira, S.; Siqueira, J. B.; Guimarães, S. E. F.; Antônio, T.; Paula, R.; Neto, T. M.; Guimarães, J. D. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. *Rev Bras Zootec*. 2010; 39:3, 503–511. https://doi.org/10.1590/S1516- 35982010000300008 .

[3] Brito, L. F. C.; Silva, A. E.; Unanian, M. M.; Dode, M. A.; Barbosa, R. T.; Kastelic, J.P. Sexual development in early and late maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*. 2004; 62, 1198-1217. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.006 .

[4] Cardilli, D. J.; Toniollo, G. H.; Pastore, A. A.; Canola, J. C.; Oliveira, J. A.; Mercadante, M. E. Z. Precocidade sexual em bovinos Nelore avaliada por ultrassonografia testicular. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014; 66:4, 1296-1298. https://doi.org/10.1590/1678-6736 .

[5] Rodrigues, N. N.; Rossi, G. F.; Vrisman, D. P.; Taira, A. R.; Souza, L. L.; Zorzetto, M. F.; Bastos, N. M.; Paz, C. C. P.; Lima, V. F. M. H.; Monteiro, F. M.; Oliveira, M. E. F. Ultrasonographic characteristics of the testes, epididymis and accessory sex glands and arterial spectral indices in peri- and post- puberta6 Nelore and Caracu bulls. *Anim Reprod Sci*. 2020; 212. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106235.

[6] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal* (CBRA). 3. ed. Belo Horizonte; 2013.

[7] Wolf, F. R.; Alquimist, J. O.; Hale, E. B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. *J Anim Sci*. 1965; 224:3, 761-765. https://doi.org/10.2527/jas1965.243761x .

Agradecimentos - Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Código financeiro 001 e também à Procriar Assistência Zootécnica e Veterinária pela cessão dos dados.

Leishmania infantum em órgãos e secreções genitais de gatos sorologicamente positivos da região metropolitana de Belo Horizonte-MG

Júlia Campos Bezerra[1]
juliac.bezerra.medvet@gmail.com
Jonas Pereira da Silva Neto[1]
Letícia Tiemi Kyuna[1]
Matheus Queiroz de Souza[1]
Guilherme Rafael Gomide Pinheiro[2]
Ana Carolina Amado Gomes[2]
Demerval Magalhães Guedes Júnior[3]
Maíra Harumi Higa Lage[4]
Danielle Silva Castro Ardison[4]
Pedro Paulo de Abreu Telles[2,3]
Wagner Luiz Tafuri[2]
Vitor Márcio Ribeiro[3]
Ricardo Toshio Fujiwara[2]
Guilherme Ribeiro Valle[1]
guilhermeribvalle@gmail.com

Abstract: *Leishmania infantum* in genital organs and secretions of 157 cats revealed 27/67 (39.1%) males and 31/90 (34.4%) females serologically (ELISA) positive in Belo Horizonte-MG, Brazil. Testicles, epididymis, ovaries, oviducts, and uterus of ELISA-positive cats were submitted to immunohistochemistry (IHQ), and genital secretions from prepuce and vulva to cPCR for identification of *L. infantum*. Spermatozoa of the 67 males was collected from right cauda of epididymis for morphology. The male *vs.* female ELISA and cPCR-positivity were compared by Fisher Exact test ($P<0.05$), and sperm morphology compared between ELISA-positive *vs.* negative toms using t Student test ($P<0.05$). From ELISA-positive cats (58/157; 36.5%), 20.7% (12/58) were cPCR-positive, higher percentual in females (10/31; 32.3%) than in males (2/27; 7.4%). All animals were IHQ-negative. Sperm morphology was similar in ELISA-positive and negative toms. We conclude that *L. infantum* may be present in genital secretions of infected cats.

Keywords: *Leishmaniasis*; feline; genital organs; genital secretions; spermatozoa.

Palavras-chave: Leishmaniose; felino; órgãos genitais; secreções genitais; espermatozoide.

[1] Departamento de Medicina Veterinária da PUC Minas.
[2] Instituto de Ciências Biológicas-UFMG.
[3] Hospital Veterinário Santo Agostinho, Belo Horizonte-MG.
[4] Associação Bichos Gerais-MG

Introdução - Doença zoonótica de ampla distribuição mundial, a Leishmaniose Visceral é uma importante enfermidade causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania infantum* a mais difundida entre as espécies do parasita, cuja principal forma de transmissão se dá pelo vetor flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* [1]. No cão, formas de transmissão não- vetoriais incluem a transmissão venérea [3] e vertical [4]. Em contrapartida, em gatos somente é reconhecida a transmissão vetorial [2]. Em cães infectados a *L. infantum* é encontrada nos testículos, epidídimos, próstata, pênis, prepúcio, sêmen e esmegma nos machos [5,6]; e ovários, útero, vagina, vulva e secreção vaginal nas fêmeas [6,7]. Não há estudos que tenham avaliado a presença da *Leishmania* sp. nos órgãos e secreções genitais de gatos, assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se *L. infantum* pode estar presente nas secreções e órgãos do aparelho genital de gatos soropositivos.

Materiais e Métodos - Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUC Minas (nº 022/2018). Gatos mestiços sexualmente maduros (157) da região metropolitana de Belo Horizonte-MG, Brasil, 67 machos e 90 fêmeas, foram submetidos a castração eletiva, dos quais amostras sanguíneas foram obtidas para avaliação sorológica para *L. infantum* por ELISA [8], considerados positivos os soros que apresentaram valores maiores que o *cutoff*, obtido pela média dos valores encontrados nos soros controle acrescida de duas vezes o desvio-padrão. Dos animais ELISA-positivos, secreção prepucial ou vulvo-vaginal, coletadas utilizando-se swabs estéreis umedecidos com água destilada estéril e friccionados delicadamente na superfície interna do órgão [4,6], foram submetidas à pesquisa de DNA de *L. infantum* por cPCR [9] utilizando-se os iniciadores F (5' CTTTTCTGGTCCCGCGGGTAGG 3') e R (5' CCACCTGGCCTATTTTACACCA 3'). Também dos animais ELISA-positivos, testículos, epidídimo esquerdo, ovários, tubas uterinas e útero foram submetidos a imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de *L. infantum* [10]. As caudas dos epidídimos direitos de todos os machos (ELISA-positivos e negativos) foram submetidas a fatiamento para coleta de espermatozoides, os quais foram fixados em solução formol-salina tamponada e morfologicamente avaliados em microscopia de contraste de fases. Comparações estatísticas entre machos e fêmeas quanto à positividade no ELISA e na cPCR foram realizadas utilizando-se o teste Exato de Fisher; e quanto à morfologia espermática (defeitos totais, maiores, menores e por região espermática) entre machos ELISA-positivos e negativos por ANOVA e teste t de Student após transformação angular dos resultados. Em todos os casos consideraram-se diferenças significativas se $P<0,05$.

Resultados e Discussão - Dos 157 gatos avaliados, 58 (36,5%) foram ELISA-positivos, sendo 27/67 machos (39,1%) e 31/90 fêmeas (34,4%) ($P>0,05$). Estes resultados são superiores à soroprevalência encontrada em diversas regiões brasileiras por ELISA, que variaram de 2,4% a 29,7% [11,12,13,14], o que aponta para região metropolitana de Belo Horizonte-MG como enzoótica para a infecção em gatos por *L. infantum.* As secreções genitais revelaram-se 20,7% (12/58) cPCR-positivas para *L. infantum*, sendo maior percentual em fêmeas (10/31; 32,3%) do que em machos (2/27; 7,4%) ($P<0,05$), achado que sugere diferente comportamento da infecção em relação aos cães, cujos trabalhos mostram maior taxa de infecção genital em

machos do que em fêmeas [3,7,15,16,17]. Não foram detectadas formas amastigotas de *L. infantum* por IHQ em nenhum dos órgãos genitais avaliados, diferentemente do observado em cães [6,15]. Entretanto, neste estudo não foram avaliadas as genitálias externas dos animais, o que permite sugerir, ainda carecendo de comprovação, que a *L. infantum* detectada nas secreções genitais dos gatos tenha origem, no caso dos machos, da superfície da glande e prepúcio, como no cão [5], ou da superfície vulvo-vaginal, como na cadela [7]. A morfologia espermática foi semelhante entre animais ELISA-positivos e negativos (P>0,05), e a comparação entre cPCR-positivos e negativos não foi realizada devido ao pequeno número de animais cPCR-positivos (2/27). Embora avaliada a morfologia de espermatozoides epididimários, e não ejaculados, este resultado sugere uma diferença entre gatos e cães, estes últimos apresentando maior percentual de defeitos espermáticos em animais doentes que em sadios [18,19].

Considerações Finais - Apesar de não ter sido detectada nos órgãos genitais internos, a *L. infantum* está presente nas secreções prepuciais e vulvo-vaginais de gatos ELISA-positvos, e que indica um potencial infeccioso dessas secreções e a possibilidade de transmissão venérea bidirecional entre gatos, ainda não demonstrada nesta espécie.

Referências bibliográficas

[1] Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M. the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012;7:e35671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671

[2] Da Silva, S. M.; Rabelo, P. F. B.; Gontijo, N. F.; Ribeiro, R. R.; Melo, M. N.; Ribeiro, V. M.; Michalick, M. S. M. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet Parasitol* 2010;174:150-154. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.005

[3] Silva, F. L.; Oliveira, R. G.; Silva, T. M. A.; Xavier, M. N.; Nascimento, E. F.; Santos, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2009;160:55-59. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079

[4] Da Silva, S. M.; Ribeiro, V. M.; Ribeiro, R. R.; Tafuri, W. L.; Melo, M. N.; Michlick, M. S. M. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol* 2009;166:159-162. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011

[5] Silva, L. C.; Assis, V. P.; Ribeiro, V. M.; Tafuri, W. L.; Toledo Júnior, J. C.; Silva, S. O.; Melo, M. N.; Rachid, M. A.; Valle, G. R. Detection of *Leishmania infantum* in the smegma of infected dogs. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2014;66:731-736. https://doi.org/10.1590/1678-41626610

[6] Boechat, V. C.; Mendes Junior, A. A. V.; Madeira, M. F.; Ferreira, L. C.; Figueiredo, F. B.; Rodrigues, F. C. C.; Oliveira, V. C.; Oliveira, R. V. C.; Menezes, R. C. Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. *Parasitol Res* 2016;155:2371-2379. https://doi.org/10.1007/s00436-016-4987-4

[7] Magro, A. G.; Assis, V. P.; Silva, L. C.; Tafuri, W. L.; Silva, S. O.; Melo, M. N.; Valle, G. R. *Leishmania infantum* is present in vaginal secretions of naturally infected bitches at lower levels in oestrogenized bitches than in non-oestrogenized bitches. *Acta Parasitol* 2017;62:625-629. https://doi.org/10.1515/ap-2017-0076

[8] Vides, J. P.; Schwardt, T. F.; Sobrinho, L. S. V.; Marinho, M.; Laurenti, M. D.; Biondo, A. W.; Leutenegger, C.; Marcondes, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. *Vet Parasitol* 2011;178:22-28. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.042

[9] Lachaud, L.; Marchergui-Hammami, S.; Chabbert, E.; Dereure, J.; Dedet, J. P.; Banstien, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2002;40:210-215. https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002

[10] Tafuri, W. L.; Santos, R. L.; Arantes, R. M. E.; Gonçalves, R.; Melo, M. N.; Michalick, M. S. M.; Tafuri, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin- embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 2004;292:17-23. https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.05.009

[11] Figueiredo, F. B.; Bonna, I. C. F.; Nascimento, L. D.; Costa, T.; Baptista, C.; Pacheco, T. M. V.; Amendoeira, M. R. R.; Madeira, M. F. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42:141-145. https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000200009

[12] Costa, T. A. C.; Rossi, C. N.; Laurenti, M. D.; Gomes, A. A. D.; Vides, J. P.; Vicente Sobrinho, L. S.; Mary, M. Occurrence of leishmaniasis in cats from endemic area for visceral leishmaniasis. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2010; 47:212-217. https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2010.26858

[13] Coelho, W. M. D.; Amarante, A. F. T.; Apolinário, J. C.; Coelho, N. M. D.; Lima, V. M. F.; Perri, S. H. V.; Bresciani, K. D. S. Soroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitol Res* 2011;109:1009-1013. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2461-x.

[14] Camprigher, V. M.; Matos, A. M. R. N.; Ferreira, F. P.; Batina, P. N.; Costa, S. C.; Navarro, I. T.; Zanutto, M. S. Occurrence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in felines in an endemic area of the State of São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2019;71:439-446. http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10291

[15] Diniz, S. A.; Melo, M. S.; Borges, A. M.; Bueno, R.; Reis, B. P.; Tafuri, W. L.; Nascimento, E. F.; Santos, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol* 2005;42:650-658. https://doi.org/10.1354/vp.42-5- 650

[16] Silva, F. L.; Rodrigues, A. A. M.; Rego, I. O. P.; Santos, R. L. H.; Oliveira, R. G.; Silva, T. M. A.; Xavier, M. N.; Nascimento, E. F.; Santos, R. L. Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 2008;151:86-90. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.032

[17] Benites, A. P.; Fernandes, C. E.; Brum, K. B.; Abdo, M. A. G. S. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesq Vet Bras* 2011;31:72-77. https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000100011

[18] Assis, V. P.; Ribeiro, V. M.; Rachid, M. A.; Castro, A. C. S.; Valle, G. R. Dogs with *Leishmania chagasi* infection have semen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. *Anim Reprod Sci* 2010;117:183-186. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.03.003

[19] Labat, E.; Carreira, J. T.; Matsukuma, B. H.; Martins, M. T. A.; Lima, V. M. F.; Bomfim, S. E. M.; Perri, S. H. V.; Koivisto, M. B. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010;62:609-614. https://doi.org/10.1590/S0102- 09352010000300016.

Agradecimentos: Projeto de pesquisa financiado pelo FIP PUC Minas 2019/22450-1S.

Alterações da morfologia espermática nas diferentes porções do trato reprodutivo de cães

Renata Lançoni[1]
renata.lançoni@ufu.br
Teresinha Inês Assumpção[1]
Laryssa Lays Araujo de Oliveira[1]

Abstract: The aim of this study was to characterize the morphological aspects of dog sperm, to take from the testicles, head and tail of the epididymis and vas deferens. Samples were collected from ten animals. Sperm morphology was assessed using phase contrast optical microscopy. The supravital test with eosin-nigrosine was also performed. The analysis of sperm morphology resulted in 47% in the testis, 65% in the head of the epididymis, 57% in the tail of the epididymis and 44% in the vas deferens. The supravital test evidenced the increase of living cells along the reproductive tract with 33% in the testis, 77 in the head of the epididymis, 80% in the tail of the epididymis and 79% in the vas deferens. The techniques used were efficient to obtain epididymal spermatozoa in dogs. It was evident that the epididymis selected and removed from the semen dead and defective cells during sperm maturation.

Keywords: sperm defects; andrology; epididymis.

Palavras-chave: defeitos espermáticos; andrologia; epidídimo.

Introdução - A espermatogênese é o processo em que as espermatogônias se dividem para formar os espermatozoides, sendo que após sua formação no ambiente testicular, o espermatozoide necessita passar por um processo de maturação para que ele seja capaz de fertilizar o oócito. Durante o processo de maturação ao longo do epidídimo os espermatozoides adquirem motilidade progressiva, potencial para sobrevivência e para o sucesso na fertilização [1]. A remoção de espermatozoides com anormalidades ocorre por fagocitose nas células epiteliais dos ductos eferentes e por macrófagos intra-epiteliais do epidídimo. Já a migração da gota citoplasmática do colo espermático para o final da peça intermediária do flagelo, ocorre durante o trajeto pelo epidídimo [2; 3]. A maturação dos espermatozoides envolve alterações morfológicas e bioquímicas na superfície deste em resposta às secreções epididimárias de enzimas, proteínas e glicoproteínas, que são essenciais no processo de fertilização [4]. O conhecimento das interações entre o microambiente do líquido luminal e a dinâmica do epitélio do epidídimo é indispensável para a compreensão do processo de desenvolvimento e amadurecimento dos espermatozoides no epidídimo [5]. O estudo das mudanças ocorridas no espermatozoide durante o trajeto pelo epidídimo permite a melhoria de biotécnicas reprodutivas [6]. Assim, antes de se estabelecer técnicas de reprodução assistida nos cães é necessário conhecer as características morfológicas dos espermatozoides nas diversas

[1] Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

porções do trato reprodutivo. Portanto, o objetivo desse estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos de espermatozoides de cães obtidos dos testículos, cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente, buscando uma técnica efetiva de colheita do material.

Material e Métodos - Foram utilizados dez animais machos adultos da espécie canina, sem raça e idade definida, provenientes do projeto de castração de cães desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Os testículos dos animais foram retirados junto com os ductos deferentes, dissecados e separados em porções: testículo, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente (figura 1). Então, os testículos receberam um corte transversal no terço médio e foram lavados internamente com solução de PBS (Dulbecco modificado). Separadamente, a cabeça e cauda do epidídimo e o ducto deferente receberam diversos cortes, que foram pressionados e lavados com a mesma solução com o objetivo de liberar os espermatozoides.

A morfologia espermática foi avaliada por microscopia de contraste de fase, com contagem de 200 células, e os resultados apresentados de forma descritiva, com cálculo da média dos dez animais, baseada nas anormalidades espermáticas encontradas.

O teste supravital foi feito através da coloração de espermatozoides, utilizando eosina-nigrosina, preparada com eosina Y (3,3g), nigrosina (20g), citrato de sódio (1,5g) e água destilada (300 ml) [7]. A avaliação foi feita em microscopia óptica contando-se 100 células e verificando a porcentagem de vivos e mortos.

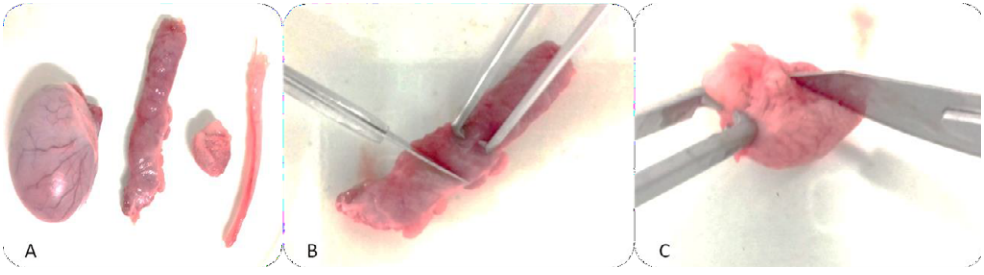


Figura 1. Dissecação e preparação dos testículos e epidídimos dos cães. A) testículo, cabeça/corpo epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente; B e C) fatiamento das diferentes porções.

Resultados e Discussão - As técnicas de lavagem do testículo e fatiamento seguido de lavagem da cabeça e cauda do epidídimo e do ducto deferente mostraram-se eficientes na recuperação das células espermáticas e resultaram em bom volume de material para análise. Estudos tem confirmado a possibilidade de recuperação de células espermáticas de epidídimos com boa qualidade mesmo após decorrido várias horas da morte do animal [8; 9].

Tabela 1 – Alterações morfológicas dos espermatozoides de cães verificadas no testículo, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente.

Tipo de alteração (%)	Testículo	Cabeça Epidídimo	Cauda Epidídimo	Ducto Deferente
Gota Citoplasmática Proximal	29	7	7	2
Contorno Anormal	5	1	0	0
Cauda Fortemente Dobrada ou Enrolada	5	17	21	19
Cauda Dobrada	4	5	4	5
Cauda Enrolada	2	0	8	6
Piriforme	0	1	0	0
Cabeça Isolada Normal	2	34	3	12
Gota Citoplasmática Distal	0	0	14	0
Total	**47**	**65**	**57**	**44**

Observamos predominância de gota citoplasmática proximal (29%) no testículo e de distal na cauda de epidídimo (14%). Houve alta incidência de cabeças isoladas principalmente na cabeça do epidídimo e de defeitos de cauda nas porções epididimárias e ducto deferente. Observou-se uma redução das gotas citoplasmáticas proximais de 29% no testículo para 2% no ducto deferente mostrando assim a maturação das células na sua passagem pelo epidídimo. Gatti [2] relatou que alta quantidade gota citoplasmática proximal (GCP) estão presentes na saída testículos e diminuiu durante a passagem no trato genital, havendo aumento nos defeitos da cauda do espermatozoide quando atinge a cauda do epidídimo, semelhante ao observado neste estudo. Há poucos relatos na literatura sobre morfologia de espermatozoides dentro do trato reprodutivo principalmente em canídeos. A elevada porcentagem de anormalidades nos espermatozoides dos cães (acima de 44%) observada tanto no testículo, epidídimo e no ducto deferente, talvez seja devido ao fato que os animais utilizados neste estudo não foram selecionados previamente para reprodução.

No teste supravital foi observado os seguintes valores quanto ao número de células não reativas (espermatozoides vivos) nos testículos: 33%; cabeça do epidídimo: 77%; cauda do epidídimo: 80% e ducto deferente: 79%, o que mostra a seleção celular que o epidídimo faz com os espermatozoides durante a sua maturação, pois segundo Varesi [11] há uma remoção de algumas células espermáticas defeituosas durante o trajeto dos espermatozoides até a cauda do epidídimo.

Conclusões - As técnicas de corte de testículos, fatiamento com lavagem da cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente mostraram-se eficientes na obtenção de amostras de sêmen. Houve alternância nos tipos de anormalidades espermáticas e na reatividade ao teste supravital ao longo do trato reprodutivo, mostrando que a maturação e seleção celular ocorrem no epidídimo. Estes resultados podem contribuir para o conhecimento das características e índice de alterações morfológicas espermatozoides de cães, visando a aplicação em técnicas de reprodução assistida.

Referências bibliográficas

[1] Robaire, B.; Hermo, L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions and their regulation. The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; 1988.

[2] Gatti, J. L; Castella, S.; Dacheux, F.; Ecroyd, H.; Metayer, S.; Thimon, V.; Dacheux, J. L. Post- testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*, 2004; 82: 321-339.

[3] Baska, K. M.; Manandhar, G.; Feng, D.; Agca, Y.; Tengowski, M. W.; Sutovsky, M.; YI, Y. J.; Sutovsky, P. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *Journal of cellular physiology*, 2008; 215: 684-696.

[4] Robaire, B; Hinton, B. T.; Orgebin-Crist, M. C. The epididymis. In: Knobil and Neill's physiology of reproduction. Academic Press, 2006. p. 1071-1148.

[5] Arrotéia, K. B.; Garcia, P. V.; Barbieri, M. F.; Justino, M. L.; Pereira, L. A. V. The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility. In: Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics. Croatia: Intech, 2012. 27.

[6] Ma, L.; Yu, H.; Ni, Z.; Hu, S.; Ma, W.; Chu, C.; Liu, Q.; Zhang, Y. *Spink13*, an epididymis- specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) Family, is essential for the acrosomal integrity and male fertility. *Journal Biology Chemical*, 2013; 288: 10154-10165.

[7] Barth, A. D. *et al*. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, 1989.

[8] Fernandez-Santos, M. R.; Martinez-Pastor, F.; Matias, D.; Dominguez-Rebolledo, A. E.; Esteso, M. C.; Montoro, V.; Garde, J. J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2009; 111: 93-104.

[9] Martinez-Pastor, F.; Corujo, A. R. D; Anel, E.; Herraez, P.; Paz, P.; Anel, L. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology***,** 2005; 64: 958-974.

[10] Rao, A. R.; Bane, A.; Gustafsson, B. K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermat ogenesis. *Theriogenology***,** 1980; 14: 1-12.

[11] Varesi, S.; Vernocchi, V.; Faustini, M.; Luvoni, G. C. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 2013; 55: 17.

Avaliação andrológica e estudo da microbiota cultivável prepucial em um *Puma concolor* jovem– Relato de caso

Marina Crisley Gondim Rebouças[1]
Caio Sérgio Santos[1]
Herlon Victor Rodrigues Silva[2]
Bruna Farias Brito[2]
Francisco Marlon Carneiro Feijó[1]
Alexandre Rodrigues Silva[1]
alexrs@ufersa.edu.br

Abstract: We describe the andrological evaluation and the analysis of the preputial mucosa's bacterial microbiota in a young *Puma concolor*. The specimen was anesthetized with dexmedetomidine and the external genitalia were evaluated. Semen collection by electroejaculation was conducted. The preputial mucosa material was collected with sterile swabs, stored at 5ºC for 3 h and submitted to bacterial and fungal culture and identification, as well as antibiogram. The specimen presented no penile spines, the presence of a penile frenulum was verified, and there were no sperm at the ejaculate, which were compatible with the estimated age of the individual, 18 months. Moreover, there was no fungal growth. Bacteria were identified as Staphylococcus sp. and Escherichia coli, both characterized as multidrug resistant. This is apparently the first report of the presence of a penile frenulum, and the first scientific description of preputial microbiota in a young puma.

Keywords: biobank; wildlife; microbioma.

Palavras-chave: biobanco, vida selvagem, microbioma.

Introdução – A onça-parda ou suçuarana (*Puma concolor* Linnaeus, 1771), é o segundo maior felídeo neotropical que ocorre no Brasil, estando presente em todos os biomas. Segundo o Instituto Chico Mendes de Biodiversidade – ICMBio [1], a espécie está inclusa na lista vermelha de animais ameaçados de extinção, na categoria vulnerável, sendo estimados aproximadamente quatro mil indivíduos restantes na natureza. Nesse sentido, é iminente a necessidade do desenvolvimento de estratégias de conservação, dentre as quais destacam-se as biotécnicas de reprodução assistida, em particular a tecnologia de sêmen. Entretanto, para o avanço desta biotecnologia, faz-se necessário o prévio conhecimento de diferentes aspectos, incluindo a microbiota genital da espécie. Esta importância deve-se ao fato que o sêmen é uma solução frequentemente contaminada e esses microorganismos podem ser prejudiciais

[1] Laboratório de Conservação de Germoplasma, Universidade Federal Rural do Semi- Árido, Mossoró, RN, Brasil.
[2] Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

às células espermáticas durante o processo de conservação do sêmen. Logo, para seu armazenamento, é imprescindível a utilização de um antibiótico capaz de reduzir a carga microbiológica sem prejudicar a qualidade seminal. Diante do exposto, o presente estudo consiste na avaliação andrológica e na identificação da microbiota prepucial de um exemplar de onça parda, seguida de antibiograma.

Material e Métodos - Uma onça-parda macho, jovem, com idade estimada em aproximadamente 18 meses, pesando 27 kg, foi capturada pela polícia ambiental na região metropolitana do município de Reriutaba, no Ceará, em julho de 2019. Na ocasião, o animal foi encaminhado para o Zoológico Municipal Sargento Prata, em Fortaleza, Ceará, onde foi submetido a uma bateria de exames no intuito de constatar sua higidez, visando sua possível soltura em um habitat adequado. No zoológico, o animal foi contido com administração de dexmedetomidina (Dexdomitor®, Zoetis, Campinas - SP, Brasil) na dose de 0,04 mg / kg, IM, combinado com cloridrato de cetamina (Ketalar®, Pfizer, São Paulo-SP, Brasil) na dose de 5 mg / kg, IM, com auxílio de uma zarabatana. Em seguida, procedeu-se a avaliação andrológica do indivíduo, incluindo coleta de sêmen por eletroejaculação [2]. Ainda, procedeu-se a coleta de secreções prepuciais com o auxílio de um swab plástico estéril, o qual foi armazenado a 5ºC por 3 h, por ocasião do transporte ao laboratório. Para a avaliação da microbiota da região genital, as amostras foram semeadas em ágar sangue com 5% de sangue ovino desfibrinado e ágar MacConkey para o cultivo bacteriano, o qual foi realizado em uma estufa de microaerofilia a 37ºC, por 24 a 48h. Já para o cultivo fúngico, as amostras foram semeadas em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (50ug/ml) e cultivadas a 28ºC por 5 dias. As colônias bacterianas em crescimento foram identificadas macro e microscopicamente, em seguida, coradas em Gram, e isoladas em caldo infusão cérebro-coração (BHI), para confirmação de sua identificação, de acordo com seu perfil bioquímico [3]. Finalmente, procedeu-se o antibiograma utilizando-se a técnica de disco-difusão [4].

Resultados e Discussão – Na avaliação andrológica do espécime, verificou-se a ausência de lesões no prepúcio, o qual facilmente permitia a mobilidade peniana. O pênis apresentou comprimento aparentemente normal para a espécie, mas evidenciava-se a ausência de espículas penianas. Este achado era um indício da imaturidade reprodutiva do animal, compatível com sua idade estimada em 18 meses. Inclusive, no presente espécime, identificou- se a presença de um frênulo peniano, o qual causava um desvio no direcionamento do pênis, sendo este, provavelmente, o primeiro relato desta condição em uma onça-parda. Em adição, a eletroejaculação resultou na obtenção de um ejaculado transparente, de aproximadamente 30 µL de volume, no qual constatou-se a ausência de espermatozoides por meio da análise microscópica. Com base no conhecimento a respeito de gatos domésticos, a ocorrência e o tamanho das espículas penianas são dependentes de andrógenos, sendo sua ausência característica de animais que ainda não atingiram a puberdade [5]. Além disso, a ruptura do frênulo peniano tende a ocorrer espontaneamente e, por ser uma condição dependente de androgênios, geralmente ocorreria durante o período puberal [6].

Tabela 1. Perfil de resistência aos antimicrobianos das bactérias isoladas (*Staphylococcus* sp e *Escherichia coli)* de Onça-parda, Fortaleza/CE 2019.

	***Staphylococcus* sp**	***E. coli***
Amicacina	R	R
Ampicilina	NA	R
Amoxicilina-clavulanato	NA	R
Aztreonam	I	I
Cefalexina	NA	R
Cefepime	NA	R
Cefotaxima	NA	R
Ceftriaxona	I	I
Cefoxitina	S	R
Ceftazidima	NA	R
Ciprofloxacina	I	I
Cloranfenicol	S	S
Eritromicina	R	NA
Gentamicina	R	R
Imipenem	NA	R
Nitrofurantoína	NA	S
Norfloxacina	S	R
Ofloxacina,	R	S
Piperacilina-tazobactam	I	I
Rifampicina	R	NA
Sulfametoxazol-trimetoprima	R	S
Tetraciclina	S	NA
Tobramicina	R	R

Legenda: S - sensível; I - intermediário; R - resistente; NA - não avaliado.

Na avaliação microbiológica da secreção prepucial da onça-parda, não foi constatada a contaminação fúngica. Por outro lado, foram identificadas as bactérias *Staphylococcus sp*. e *Escherichia coli*. Tais bactérias assemelham-se àquelas corriqueiramente encontradas na secreção prepucial de gatos domésticos [7]. Os *Staphylococcus sp*. foram sensíveis a 4 (26,7%) dos 15 antibióticos testados, como cefoxitina, cloranfenicol, norfloxacina e tetraciclina, enquanto a *E. coli* foi sensível a 4 (20%) das 20 drogas testadas, como cloranfenicol, nitrofurantoína, ofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprima (Tabela 1).

Considerações Finais – Relatos de avaliação andrológica em indivíduos selvagens vêm sempre somar no conhecimento da fisiologia reprodutiva da espécie. Assim, a relevância do presente relato se configura, provavelmente, na primeira notificação científica da presença de frênulo peniano em uma onça-parda (*Puma concolor*) jovem, denotando sua similaridade fisiológica aos gatos domésticos. Em adição, foi também descrita, pela primeira vez, a microbiota prepucial na espécie, sendo esta composta primariamente por *Staphylococcus sp*. e *Escherichia coli*.

Referências bibliográficas

[1] ICMBio (Ed.). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*: s. Brasilia: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2018. 625 p.

[2] Silva, H. V. R.; Nunes, T. G. P.; Ribeiro, I. R.; Freitas, I. A.; Oliveira, M. F.; Neto, A. C. A.; Silva, A. R.; Silva, L. D. M. h. Morphology, morphometry, ultrastructure, and mitochondrial activity of jaguar (*Panthera onca*) sperm. *Anim Reprod Sci* 2019;203:84-93, 2019. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.011

[3] MacFaddin, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

[4] Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C.; Turck, M. D. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Microbiol*., 40: 2413-5, 1966.

[5] Aronson, L. R.; Cooper, M. L. Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. *Anat Rec*. 1967;157:71-8

[6] Boothe, H. W. Diseases of the external male genitalia. In: Morgan, R. V. (ed.) *Handbook of small animal practice*. 5. ed. Philadelphia: Saunders; 2008. p. 587-592. http://dx.doi.org/10.1016/B978 1 4160 3949 5.50063 7

[7] Ferreira, M. C.; Nobre, D.; Oliveira, M. G. X. de; Oliveira, M. C. V. de; Cunha, M. P. V. da; Menão, M. C. *et al*. Agentes bacterianos isolados de cães e gatos com infecção urinária: perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. *Atas de Saúde Ambiental* – ASA. 2014;2(2):29–37.

Agradecimentos: À equipe do Zoológico Sargento Prata, Fortaleza, CE.

Environmental conditions affect the sperm quality of agoutis (*Dasyprocta leporina*) during the dry period of a semiarid region

Maiko Roberto Tavares Dantas[1]
Andréia Maria da Silva[1]
Ana Glória Pereira[1]
Caio Sérgio Santos[1]
João Batista Freire Souza-Junior[1]
Alexandre Rodrigues Silva[1]
alexrs@ufersa.edu.br

Abstract: We evaluate the relationships among some environmental elements and the kinematic parameters of agouti (*Dasyprocta leporina*) epididymal sperm, during dry season in a semiarid region. The sperm was recovered from the epididymis cauda of 07 individuals. The evaluations of kinematic parameters were assessed by computerized analysis (CASA). The most significant correlations were related to the means of the 42 days before the day in which sperm collection was conducted: sperm motility was negatively correlated to the temperature (ρ = -0.78) and solar radiation (ρ = -0.78); static subpopulation was correlated to the temperature (ρ = 0.78) and solar radiation (ρ = 0.78); while wind speed was negatively correlated to the rapid subpopulation (ρ = - 0.78) and sperm curvilinear velocity (ρ = -0.76). During the dry period, some environmental elements of a semiarid region presented a strong negative relationship with the quality of sperm parameters of captive-bred agoutis.

Keywords: Caatinga; germplasm; wildlife.

Introduction - Understanding the characteristics of the reproductive physiology of wild rodents, can result in the preservation of ecosystems, minimizing impacts caused by anthropic action or natural causes, such as global warming. Since wildlife breeding is strongly influenced by environmental factors, some climatic elements may impair or contribute to the quality of rodent reproductive parameters [1, 2]. Thus, it is necessary to know these interactions in order to establish and improve protocols for more efficient management or application of biotechniques to the conservation of rodents' genetic material. The agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) is a medium-sized wild rodent adapted to the semiarid region that has ecological importance as a seed disperser, prey for carnivores, and as a source of protein for human consumption, which justifies the significance of this study. Therefore, we aimed to evaluate the relationships among environmental elements and the kinematic parameters of agouti (*D. leporina*) epididymal sperm during the dry season in a semiarid region.

[1] Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil.

Material and methods - The study was conducted at the Center for Wildlife Multiplication, located at the Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brazil (5° 11 S, 37° 22 W, 18 m above sea level). The epididymis were obtained from 7 sexually mature males agouti, euthanized during the dry season (September and October 2019), as approved by the UFERSA Animal Use Ethics Committee (CEUA: Opinion 11/2019) and by the Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio: Opinion 66618-3). The sperm was recovered from the epididymis cauda using the flotation technique [3]. The evaluations of kinematic parameters were assessed by computerized analysis (CASA; IVOS 12.0, Hamilton-Thorne), using 5 µl of the semen sample [4]. There were analyzed: total motility (%), progressive motility (%), velocity average pathway (VAP, µm/s), velocity straight line (VSL, µm/s), velocity curvilinear (VCL, µm/s), amplitude lateral head (ALH, µm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %) and linearity (LIN, %). Also, the total sperm population was subdivided into four categories: rapid, medium, slow, and static (%). The environmental elements observed were Temperature (T, °C), Humidity (H, %), Wind Speed (W, m/s), and Solar Radiation (SR, W/m2), obtained from a nearby meteorological station installed on the enclosure of the animals [5]. Once data presented non-linear relations, the Spearman's correlation test was applied using the PROC CORR of SAS software to evaluate the correlation of the sperm parameters with the environmental variables from specific days priors to the collection. Therefore, we consider the previous day (Day 1st), the seventh day (Day 7th), the 21st (Day 21st), and the 42nd day (Day 42nd) priors to the day of sperm collection. For each of these days, the means of the environmental variables were calculated based on measurements every 15 minutes throughout the 24 hours by the meteorological station. Besides, the "Mean 42 Days" was observed, which referred to the means of the environmental variables among all the forty-two days prior to the day of sperm collection. We chose 42 days for the most prolonged period because this is the time corresponding to agouti spermatogenesis. The correlations were considered significant when $P < 0.05$.

Results and Discussion - For Day 1st and Day 7th before sperm collection, no significant correlation among evaluated parameters was found. Likewise, no significant relation was found between humidity and sperm parameters at any time. Because of this, this environmental element, and those days (Days 1st and 7th) are not shown in table 1. Regarding the day 21st, 42nd, and the "mean of 42 days", correlations are presented at the Table 1.

Table 1. Correlations among kinematic parameters of agouti (*Dasyprocta leporina*) epididymal sperm and climatic elements evaluated at the 21st and 42nd days, as well as at the mean of all the 42 days, before sperm collection, in the dry period of the Brazilian semiarid region.

Climatic elements	Day 21st	Day 42nd	Mean 42 Days
Temperature (T)	-	-	Motility: ρ = -0,78 (P = 0.037) Static subpopulation: ρ = 0.78 (P = 0.037)
Wind speed (W)	Rapid subpopulation:ρ = -0.78 (P = 0.037) VCL: ρ = -0.76 (P =0.045)	LIN: ρ = -0.77 (P = 0.041)	Rapid subpopulation: ρ = -0.78 (P = 0.037) VCL: ρ = -0.76 (P = 0.045)
Solar radiation (SR)	-	BCF: ρ = 0.87 (P = 0.01)	Motility: ρ = -0.78 (P = 0.037) Rapid subpopulation: ρ = 0.78 (P = 0.037)

Since the reproduction of rodents is strongly influenced by environmental factors, it was expected that during the dry period of a semiarid region, the high average of temperature and solar radiation, as well as the scarcity of rainfall, would harm the reproductive parameters, thus decreasing the sperm quality [1, 5, 6]. In the present study, it was verified that the decrease in sperm quality was increasingly greater and more significant as the more days the animals suffered the effects of environmental elements in the dry period [1, 7]. When observing the sperm characteristics of rodents throughout the year, the worst average values for sperm quality are found during the driest period [2]. This showed that high temperatures and long-term solar radiation cause deleterious effects during rodent's spermatogenesis, especially those related to sperm motility and speed [2, 5]. Thus, this study shows that it is possible to predict the motility quality of agouti's sperm, using the mean values of temperature, wind speed, and solar radiation from the mean of 42 days preceding the collection day.

Final considerations - During the dry period in the semiarid region, the climatic elements temperature, wind speed, and solar radiation have a strong negative relationship with the quality of sperm parameters of captive-bred agoutis. Knowing this information is important to establish conservation strategies for the species.

Referências bibliográficas

[1] Sarli, J.; Lutermann, H.; Alagaili, A. N.; Mohammed, O. B.; Bennett, N. C. Seasonal reproduction in the Arabian spiny mouse, *Acomys dimidiatus* (Rodentia: Muridae) from Saudi Arabia: The role of rainfall and temperature. *J Arid Environ*. 2016;124:352-359. https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.09.008.

[2] Cruceño, A. M.; de Rosas, J. C.; Fóscolo, M.; Chaves, E. M.; Scardapane, L.; Dominguez, S.; Aguilera- Merlo, C. Effects of Photoperiod on Epididymal and Sperm Morphology in a Wild Rodent, the Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). ISRN Anat. 2013:128921. https://doi.org/10.5402/2013/128921. PMid: 25969823.

[3] Ferraz, M. S.; Menezes, D. J. A.; Pessoa, G. T.; Cabral, R. M.; Illera, M. J.; Silva, A. R.; Carvalho, M. A. M. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). *Theriogenology*. 2021;75:459-462. http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.013.

[4] Castelo, T. S.; Silva, A. M.; Bezerra, L. G. P.; Costa, C. Y. M.; Lago, A. E. A.; Bezerra, J. A. B.; Campos, L. B.; Praxedes, E. C. G.; Silva, A. R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology* (Print). 2015;442-447. http://dx.doi.org/10.1111/rda.12517.

[5] Queiroz, J. P. A. F.; Souza Jr., J. B. F.; Oliveira, V. R. M.; Costa, L. L. M.; Oliveira, M. F. How does Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii Wagler*, 1831) face the thermal challenges of the Brazilian tropical dry forest?. *J Therm Biol*. 2020;88:102525. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102525. PMid:32126000.

[6] Dantas, M. R. T.; Souza-Junior, J. B. F. The role of behavioral, autonomous, and adaptive processes in the rodent's thermoregulation. *J Anim Behav Biometeorol*. 2021;9:2120. http://dx.doi.org/10.31893/jabb.21020.

[7] Muteka, S. P.; Chimimba, C. T.; Bastos, A. D.; Bennett, N. C. The Reproduction Pattern of in the *Gerbilliscus cf. leucogaster* (Rodentia: Muridae) from Namibia. *Can J Zool*. 2018;97:57-62. https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0090.

Acknowledgments: To Capes (Financial Code 001).

Degeneração testicular em veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*) Zimmermann, 1780: Relato de caso

Teresinha Inês de Assumpção[1]
teassumpcao@ufu.br
Athos de Assumpção Pastore[2]
José Maurício Barbanti Duarte[3]
Caroline Silva Vieira[1]

Abstract: A white-tailed deer of the species *Odocoileus virginianus* 8-year-old had a history of infertility a few years ago. In the clinical-reproductive evaluation, after its chemical containment, the animal presented ovoid, asymmetric and slightly flaccid testicles. In the ultrasound examination, mediastinum with irregular shape and increased width was observed, a heterogeneous echogenicity pattern, with anechoic areas different from normal patterns. Semen collection was by electroejaculation and its analysis revealed the following picture: semen with a watery appearance and grayish-white color, 0% motility and vigor, 83% of total sperm abnormalities, with 66% of major defects and 17% of minor defects and 17.09% of cells with membrane integrity. It was concluded that the infertility picture observed in the deer it was due to a testicular degeneration, the confirmation of the diagnosis being given by ultrasound examination and the seminal findings.

Keywords: andrology; cervids; spermatozoa.

Palavras-chave: andrologia; cervídeo; espermatozoide.

Introdução - A degeneração testicular é a principal causa de redução da fertilidade nos machos, pois provoca alterações do parênquima testicular levando a disfunções bioquímicas e estruturais nas células da linhagem germinativa [1], com queda drástica na qualidade dos espermatozoides, afetando de forma negativa a motilidade espermática e aumentando os defeitos espermáticos, o estresse oxidativo celular e a fragmentação do DNA [2]. A degeneração testicular pode ser resultante de vários fatores, como a temperatura do ambiente elevada, intoxicações, infecções, desequilíbrios nutricionais, alterações vasculares e distúrbios hormonais, agentes inespecíficos, infecção local, traumas, dermatites, fatores autoimunes, agentes químicos, entre outros [3]. A degeneração testicular pode levar a redução do volume testicular e maior flacidez gonadal, sempre com distúrbios na espermatogênese e alterações no espermiograma. A ultrassonografia auxilia positivamente no diagnóstico das alterações degenerativas do testículo, mostrando uma imagem do estroma testicular mais heterogênea

[1] Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.
[2] Androvet, Sertãozinho, SP.
[3] NUPECCE, UNESP, Jaboticabal, SP.

do que o normal, pois em certos casos só os exames clínicos junto a análise do sêmen não são suficientes para a obtenção de um diagnóstico conciso para a queda na fertilidade [4]. Objetivou-se com este trabalho relatar um caso de degeneração testicular em cervo de cauda branca (*Odocoileus virginianus)*.

Relato do caso: Um cervo de cauda branca da espécie *Odocoileus virginianus*, 8 anos de idade, peso corporal 40 quilos, pertencente ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da UNESP, Jaboticabal, SP. O animal apresentava um histórico de infertilidade desde sua puberdade e não produziu nenhum filho, apesar de apresentar libido e cópula normais. O animal foi contido quimicamente com uma associação dos anestésicos cloridrato de xilazina (1mg/kg) e cloridrato de quetamina (10mg/kg), por via intramuscular. No exame do sistema reprodutor constatou-se testículos ovoides flácidos (escala de 1 a 3 – flácidos, elásticos e duro- elásticos), sendo o testículo esquerdo com dimensões de 4,1 x 2,6 cm e testículo direito com dimensões 3,3 x 2,3 cm (aferidos com paquímetro). O exame ultrassonográfico foi feito com ultrassom modelo DM10V Pro Domed, modo B, onde observou-se mediastino com formato irregular e aumento na largura, padrão de ecogenicidade heterogêneo, havendo áreas anecoicas diferentes dos padrões normais (figuras 1 e 2). A coleta de sêmen foi realizada pela técnica de eletroejaculação, segundo o descrito por Duarte e Garcia [5]. O ejaculado teve volume de 0,5 mL, aspecto aquoso e coloração branco acinzentada, com odor "*suis generis*". A motilidade e o vigor foram analisados sob microscopia óptica mostrando 0% de motilidade e vigor, com muitas células de descamação. A análise morfológica feita em câmara úmida sob contraste de fase, sendo as anormalidades classificadas de acordo com CBRA (classificação de bovinos pois não há classificação para cervídeos) [6], que resultou em 83% de defeitos totais, sendo 66% de defeitos maiores e 17% de defeitos menores, sendo a maioria de defeitos na cabeça do espermatozoide. A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides coradas com iodeto de propídio/ SYBR-14 foi avaliada por citometria de fluxo (Cyflow®) e revelou 17,10% de células com membranas íntegras.

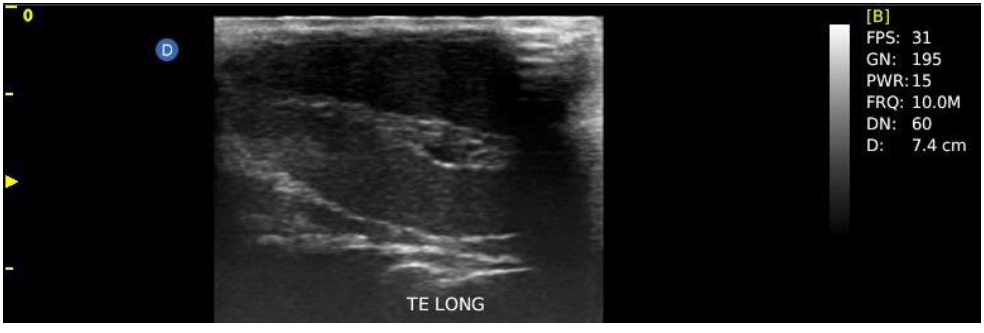


Figura 1- Imagem ultrassonográfica do testículo esquerdo do cervo de cauda branca, corte longitudinal mostrando o mediastino com forma irregular.

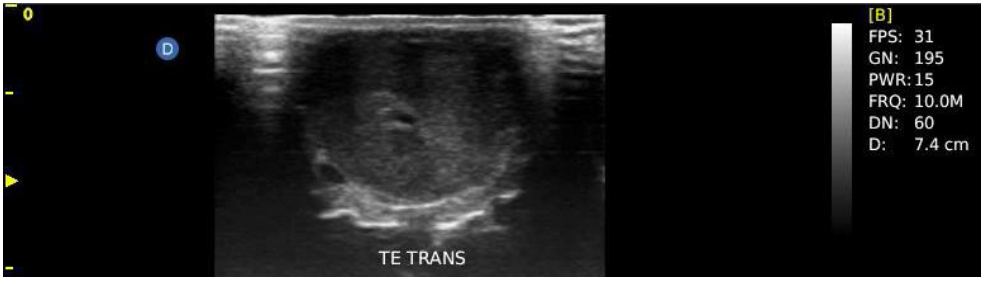


Figura 2- Imagem ultrassonográfica do testículo esquerdo do cervo de cauda branca, corte transversal mostrando o mediastino com forma irregular.

Discussão - O histórico do animal associado a avaliação ultrassonográfica, levaram à suspeita de degeneração testicular, o que foi confirmado pela avaliação andrológica. Assim como observado no presente relato, também em bovinos é verificado que o testículo afetado por degeneração testicular tem consistência flácida à palpação e ejaculado de baixa motilidade e concentração espermática com elevado número de espermatozoides com anormalidades morfológicas [1]. Aliado a isso, as imagens obtidas na ultrassonografia são compatíveis com as encontradas em casos de degeneração testicular de outras espécies como caprinos e bovinos, caracterizadas por mediastinos espessos e irregulares com áreas escuras [7, 8], mostrando assim que esta é uma técnica valiosa e não invasiva de avaliação testicular, pois a intensidade de pixels está diretamente associada com a qualidade do sêmen do animal. Em animais selvagens, a literatura é escassa no assunto. Em camelos (*Camelus dromedarius*) a relação entre os resultados da ultrassonografia testicular e análise de sêmen teve uma precisão de 92,5%, sendo considerada uma ótima ferramenta para diagnóstico de infertilidades nesta espécie, como a degeneração testicular [9]. Em catetos (*Tayassu tajacu*) a degeneração testicular é de alta incidência, sendo diagnosticada em 62,5% dos animais com patologias testiculares [10].

Considerações Finais - Concluiu-se que o quadro de infertilidade observado no cervo de cauda branca (*Odocoileus virginianus)* era devido a uma degeneração testicular, sendo que o exame ultrassonográfico e os achados seminais foram importantes para confirmação do diagnóstico.

Referências

[1] Garcia, A. R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Revista Brasileira Reprodução Animal* 2017; 41(1): 33-39.

[2] Alves, M. B. R.; Andrade, A. F. C.; Arruda, R. P.; Batissaco, L.; Florez-Rodriguez, S. A.; Oliveira, B. M. M.; Torres, M. A.; Lançoni, R.; Ravagnani, G. M.; Filho, R. R. P.; Vellone, V. S.; Losano, J. D. A.; Franci, C. R.; Nichi, M.; Celeghini, E. C. C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by Infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. *Theriogenology* 2016; 86: 795–805.

[3] Nascimento, E. F.; Santos, R. L. *Patologias da reprodução dos animais domésticos*. 3. ed. Guanabara: Koogan, 2011. 172p.

[4] Celeghini, E. C. C.; Alves, M. B. R.; Oliveira, B. M. M.; Batissaco, L.; Pinto, S. C. C.; Gonzaga, V. H. G.; Nogueira, V. J. M.; Garcia-Oliveros, L. N.; Almeida, F. S. Degeneração testicular: visão científica. In: Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal, II, 2017. *Anais* [...] Uberlândia, MG: Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2017. p. 30-36.

[5] Duarte, J. M. B.; Garcia, J. M. Reprodução assistida em cervídeos brasileiros. R*evista Brasileira de Reprodução Animal* 1995; 19(1-2): 111-121.

[6] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal* (CBRA). 3 ed. Belo Horizonte, 2013. 103p.

[7] Ahmad, N.; Noakes, D. E. Ultrasound imaging in determining the presence of testicular degeneration in two male goats. *British Veterinary Journal* 1995, 151: 101-110.

[8] Arteaga, A. A.; Barth, A. D.; Brito, L. F. C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology* 2005, 64: 408-415.

[9] Waheed, M. M.; Ghoneim, I. M.; Hassieb, M. M.; Alsumait, A. A. Evaluation of the Breeding Soundness of Male Camels (*Camelus dromedarius*) via Clinical Examination, Semen Analysis, Ultrasonography and Testicular Biopsy: A Summary of 80 Clinical Cases. *Reproduction Domestic Animals* 2014; 49:790–796.

[10] Filgueira, K. D.; Moura, C. E. B.; Batista, J. S.; Silva, S. M. M. S.; Oliveira, M. P.; Albuquerque, J. F. G.; Migliano, M. A. Biometria e alterações histopatológicas em testículos de catetos (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro no semi-árido nordestino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 2005, 1: 19-25.