

Anais da



Reunião Anual da

ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal

8 e 9 de junho de 2018

ABRAA

Associação Brasileira de Andrologia Animal



REITOR
Marcelo Augusto Santos Turine

VICE-REITORA
Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Divisão de Editora da UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)
(3:2018: Campo Grande, MS).
Anais da III Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 08
e 09 de junho de 2018 / organizadores Eliane Vianna da Costa e Silva et al. –
Campo Grande, MS: UFMS, 2018.
231 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

e-ISBN 978-85-7613-588-3

Disponível em: <<http://www.reuniaoabraa.com.br/>>

1. Andrologia. 2. Inseminação Artificial. I. Silva, Eliane Vianna da Costa e. II.
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. III. Título.

CDD (22) 616.69

Elaborada pela Bibliotecária Lilian Aguilar Teixeira CRB 1/2448



Divisão de Editora Universitária
Portão 14 - Estádio Morenã
Campus da UFMS
Fone: (67) 3345-7200 - Campo Grande - MS
e-mail: diedu.secom@ufms.br

Editora associada à



ORGANIZADORES

Eliane Vianna da Costa e Silva

Juliana Corrêa Borges Silva

Luiz Alfredo Garcia Deragon

Marco Antônio Carstens Mendonça

Anais da

Reunião Anual da
ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

8 e 9 de junho de 2018

Campo Grande-MS
2018



ORGANIZADORES

Eliane Vianna da Costa e Silva
Médica-Veterinária, Doutora
Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Campo Grande, MS

Juliana Corrêa Borges Silva
Médica-Veterinária, Doutora
Pesquisadora da Embrapa Pantanal Corumbá, MS

Luiz Alfredo Garcia Deragon
Médico-Veterinário, Mestre Alta Genetics do Brasil
Uberaba, MG

Marco Antônio Carstens Mendonça
Médico-Veterinário, Mestre
Reprotec Ltda. Campo Grande, MS

REVISÃO LINGUÍSTICA E ORTOGRÁFICA
De responsabilidade dos autores

PROJETO GRÁFICO E EDITORAÇÃO ELETRÔNICA
Divisão de Planejamento Visual e
Produção Gráfica

COMISSÃO ORGANIZADORA
ABRAA - Associação Brasileira de Andrologia Animal



e-ISBN: 978-85-7613-588-3
1ª edição
Formato digital (2018)

FICHA TÉCNICA

Reunião Anual da
ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal
Ribeirão Preto, dias 8 e 9 de Junho de 2018

Comissão Organizadora

PRESIDENTE
Rubens Paes de Arruda
VICE-PRESIDENTE
Eliane Vianna da Costa e Silva

PRIMEIRO SECRETÁRIO
Alexandre Rossetto Garcia

SEGUNDO SECRETÁRIO
Gustavo Eduardo Freneau

PRIMEIRO TESOUREIRO
Athos de Assumpção Pastore

SEGUNDA TESOUREIRA
Teresinha Inês de Assumpção

DIRETORA TÉCNICO CIENTÍFICA
Juliana Corrêa Borges Silva

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO
Luiz Alfredo Garcia Deragon

DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO
Marco Antônio Carstens Mendonça

DIRETOR DE COMUNICAÇÃO E MARKETING
Gustavo Eduardo Freneau

DIRETOR COMERCIAL
Neimar Correa Severo

REVISORES

Alessandra Corallo Nicacio
Embrapa Gado de Corte

Aline Quadros Santos Bonilla
Cogent IVF, LLC

Breno Fernandes Barreto Sampaio
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

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

Eriklis Nogueira
Embrapa Pantanal

Gustavo Eduardo Freneau
Universidade Federal de Goiás

Heitor Romero Marques Júnior
Universidade Católica Dom Bosco

Isabel Candia Nunes da Cunha
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Juliana Corrêa Borges Silva
Embrapa Pantanal

Luiz Alfredo Garcia Deragon
Alta Genetics do Brasil Ltda.

Maria Emilia Franco Oliveira
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP

Rodrigo Freitas Bittencourt
Universidade Federal da Bahia

Rubens Paes de Arruda
Universidade São Paulo

Teresinha Inês Assumpção
Universidade Federal de Uberlândia

Thyara Deco-souza
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Apresentação

A III Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal se consolida como um Fórum de debates na Andrologia Brasileira, inovando o formato das Reuniões científicas privilegia participação do público como parte efetiva da reunião.

Em 2018, a ABRAA foi oficialmente reconhecida como Associação Científica, motivo de muito orgulho para aqueles que sonharam este modelo de reunião fundamentada no debate. Queremos que a ABRAA se transforme e transforme a comunidade científica que dela participa com seus debates de alto nível auxiliando na formação do espírito crítico na comunidade de médicos veterinários pesquisadores, docentes, profissionais liberais, técnicos da área comercial e principalmente os jovens que a se iniciam na andrologia animal.

Eliane Vianna da Costa e Silva
Vice-Presidente da ABRAA



| | |
|---|-----------|
| Palestras | 11 |
| Patologias clínicas reprodutivas e resultados de tratamentos | 12 |
| Otávio Mitio Ohashi, Simone do Socorro Damasceno Santos, Nathália Nogueira da Costa Almeida, Thiago Velasco Guimarães Silva, Marcela da Silva Cordeiro e Sebastião Tavares Rolim Filho | |
| Afecções reprodutivas e sua influência na fertilidade do garranhão | 26 |
| Gabriel Augusto Monteiro, Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva, Juliana Horta Wilke Diniz, Deborah Freitas Silva | |
| Fertilidade de touros em programa de IATF | 42 |
| Fabio Girardi Frigoni | |
| Sêmen bovino refrigerado: por que e quando utilizar? | 46 |
| Juliana Corrêa Borges Silva | |
| Processamento de sêmen e fertilidade em ovinos e caprinos | 51 |
| Leandro Rodello | |
| Processamento de sêmen e fertilidade em pequenos animais | 54 |
| Maria Isabel Mello Martins | |
| Exame clínico-andrológico para seleção de touros jovens | 60 |
| Eliane Vianna Costa e Silva, Luiz Carlos Cesar Costa Filho, Fernanda Battistotti Barbosa, Marcos Vargas da Silveira, Ellen Caroline Soligo, Alini Silva Peixoto, Tallita Silva de Assis Sales, Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo, Joana Carolina Trindade Barbosa, Ludomir Zalesky e Luis Carlos Francisco da Silva | |
| Resumos | 67 |
| As estações do ano influenciam na qualidade do sêmen de touros Nelore | 68 |
| Camila Dutra de Souza, Talita Raquel Cavichioli Sebastião, Gabriela Figueredo Cornacini, Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak e Marcelo George Mungai Chacur | |
| Avaliação da longevidade espermática em sêmen de búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) refrigerado à 5°C | 72 |
| Jaci Almeida, Beatriz Parzewski Neves, Mayara Ferreira Brito, Verônica Alexandra Becerra Becerra, Patrícia Alencar Auler e Marc Henry | |
| Testicular volume growth curves and sperm traits in the highest and the lowest spectrum of scrotal circumference in Nellore bulls | 77 |
| Jurandy Mauro Penitente-Filho, Edgar Andrés Diaz-Miranda, Denise Okano, Paula Piccolo Maitan, Bruna Waddington, Danielle Estanislau Coelho Silva, Juliana Nascimento Duarte Rodrigues, Faider Alberto Castaño Villadiego e José Domingos Guimarães | |

| | |
|--|------------|
| Uso da equação de Michaelis-Menten na descrição do crescimento da circunferência escrotal em touros Nelore | 81 |
| Paula Piccolo Maitan, Jurandy Mauro Penitente-Filho, Denise Silva Okano, Edgar Andrés Díaz-Miranda, Daniele Estanislau Coelho Silva, Bruna Waddington de Freitas e José Domingos Guimarães | |
| Residual autocorrelation of the Logistic model in testicular volume growth curve of Nelore bulls | 85 |
| Edgar Andrés Díaz-Miranda, Jurandy Mauro Penitente-Filho, Denise Silva Okano, Bruna Waddington, Paula Piccolo Maitan, Danielle Estanislau Coelho Silva e José Domingos Guimarães | |
| Mudanças morfológicas do espermatozoide no trato reprodutivo de cães | 89 |
| Teresinha Inês de Assumpção, Gustavo Guerino Macedo e Laryssa Lays Araujo de Oliveira | |
| Diluentes para o resfriamento de sêmen em jacarés tinga (<i>Caiman crocodilus</i>) | 93 |
| Teresinha Inês de Assumpção, André Luiz Quagliatto Santos e Adrielly Julien Silva Lopes | |
| Semen collection by urethral catheterization in giant anteaters (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>): an alternative to electro-ejaculation | 97 |
| Lilja Fromme, Teresinha Inês Assumpção, André Luiz Quagliatto Santos, Evandro Canelo, Flávia Regina Miranda, Gediendson Ribeiro Araújo, Ralph Brehm e Ursula Siebert | |
| Avaliação dos parâmetros Doppler velocimétricos, qualidade espermática e níveis séricos de testosterona em cães férteis | 100 |
| Marcelo Carvalho dos Santos, Barbara Contiero, Stefano Romagoli e Isabel Candia Nunes da Cunha | |
| Cluster analysis of nonlinear models used to describe testicular volume growth curve in Nelore bulls | 104 |
| Danielle Estanislau Coelho Silva, Jurandy Mauro Penitente-Filho, Denise Silva Okano, Edgar Andrés Díaz, Paula Piccolo Maitan, Bruna Waddington e José Domingos Guimarães | |
| Fitting nonlinear models to describe scrotal circumference growth in Montana Tropical composite bulls | 108 |
| Denise Silva Okano, Jurandy Mauro Penitente-Filho, Edgar Andrés Díaz, Paula Piccolo Maitan, Bruna Waddington, Danielle Estanislau Coelho Silva e José Domingos Guimarães | |
| Influencia da estação do ano sobre o perfil bioquímico do ejaculado de ovinos | 111 |
| Marcelo Piagentini, Danilo Cunha da Silva, Carla Fredrichsen Moya-Araujo, Gustavo H. Marques Araujo, Rodrigo Garcia e Eunice Oba | |
| Efeito da estação do ano e do horário do dia sobre os parâmetros dopplervelocimétricos da artéria testicular de ovinos adultos criados em clima tropical úmido | 115 |
| Juliana Nascimento Duarte Rodrigues, Jurandy Mauro Penitente-Filho, Camilo José Ramirez Lopes, Celina Alves de Oliveira, Rafael Souza Freitas, Thialla Emille Costa do Nascimento, Erick Fonseca de Castilho, Luiz Fernando de Souza Rodrigues e José Domingos Guimarães | |
| Efeito paradoxal do antioxidante quercetina sobre a cinética e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação | 119 |
| Marcelo Sant'Ana Borges, Joana Larissa Barbosa Born, Ana Carolina Silva Teixeira, Leticia Martins Conti, Frederico Ozanam Papa, José Antônio Dell'Aqua Jr. e André Maciel Crespilho | |
| Seminoma associado a queda de fertilidade em equino: relato de caso | 123 |
| Juliana Horta Wilke Diniz, Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva, Isabella Macedo Coutinho, Deborah Freitas Silva, Leticia de Oliveira Cota, Bruno Dondoni Malacarne, Beatriz Novaes Telles Ribeiro, Felipe Pierezan, Andressa Batista da Silveira Xavier e Gabriel Augusto Monteiro | |

| | |
|---|------------|
| A recentrifugação do sobrenadante permite aumentar a recuperação de espermatozoides equinos destinados à criopreservação? | 127 |
| Karoline Maria Gil Braz, Marcelo Augusto Macedo Pinto, Gustavo Mendes Gomes, Leticia Patrão de Macedo Gomes, Kleber da Cunha Peixoto Jr. e André Maciel Crespilho | |
| Biometria de glândulas genitais acessórias em touros jovens Nelore, Caracu e Senepol | 131 |
| Naiara Nantes Rodrigues, Guilherme Fazan Rossi, André Lasmar Guimarães, Dayane Priscila Vrisman, Renata Chichitostti Dal Bem, Anielle de Paula Freitas, Fabio Morato Monteiro e Maria Emilia Franco Oliveira | |
| Efeito da Coenzima Q-10 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de ganhões <i>bad e good freezers</i> | 135 |
| Renata Lançoni, Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Carla Patricia Teodoro de Carvalho, Gabriela Bertaiolli Zoca, Laura Nataly Garcia-Oliveros, Leonardo Batissaco e Rubens Paes de Arruda | |
| Avaliação do sêmen bovino: quais parâmetros possuem relação com as taxas de concepção de vacas submetidas à IATF? | 138 |
| Augusto Rodrigues Felisbino Neto, Lorenzo Garrido Sagabinazzi, Kleber da Cunha Peixoto Jr., Karoline Maria Gil Braz, Gustavo Mendes Gomes e André Maciel Crespilho | |
| Taxas de prenhez em função de características reprodutivas de diferentes linhagens de touros Canchim | 142 |
| Narian Romanello, Alexandre Rossetto Garcia, Cintia Righetti Marcondes, André de Faria Pedroso, Sérgio Novita Esteves, Verônica Schinaider do Amaral Pereira, Daniela Botta, Andréa do Nascimento Barreto, Marco Antonio de Paula Sousa e Alessandro Giro | |
| Morfometria espermática de touros Tabapuã, Nelore e Angus e a relação com parâmetros de cinética e morfologia espermática | 146 |
| Luana Gomes Fernandes, Naiara Nantes Rodrigues, Maria Eugênia Zerlotti Mercadante e Fabio Morato Monteiro | |
| Influência da catalase na integridade de membrana do sêmen criopreservado de machos Nelore suplementados com ácidos graxos poliinsaturados | 150 |
| Natalia Marins Bastos, Guilherme Fazan Rossi, Naiara Nantes Rodrigues, Dayane Priscila Vrisman, Mariana Furtado Zorretto, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua, Fabio Morato Monteiro, Gisele Zoccal Mingoti e Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima | |
| Avaliação das características andrológicas de ovinos das raças Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel | 154 |
| Carlos Augusto Capelassi Gomes, Leandro da Silva Correa, Marcelo Henrique Fumagalli, Jeniffer Naryman Hirt, Fabíola Cristine Rêgo Grecco, Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho e Flávio Guiselli Lopes | |
| Em qual momento do processo de congelamento do sêmen equino ocorrem as alterações das membranas espermáticas? | 158 |
| Carla Patricia Teodoro de Carvalho, Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Guilherme Pugliesi, Renata Lançoni, Gabriela Bertaiolli Zoca, Gabriel De Carli dos Santos, Laura Nataly Garcia Oliveros, Danilo França de Souza, Thyago Escodro Dércoli e Rubens Paes de Arruda | |
| Carcinoma de células escamosas em prepúcio de cavalo Quarto de Milha | 161 |
| Felipe da Silva Neri, Rodrigo Freitas Bittencourt, Catharina de Albuquerque Vieira, Alessandro Bitencourt Nascimento, Lara Nunes Sousa, Mariana de Queiroz Sampaio, Maicon Pereira Lents, Adriano de Oliveira Gordilho Filho, João Victor Gomes da Silva Carvalho e Maristela de Cássia Seudo Lopes | |
| Avaliação da compactação do DNA espermático em sêmen bubalino | 165 |
| Ana Júlia Mota de Lima, Arnaldo Algaranhar Gonçalves, Carlos Vinícius da Silva Nascimento, Diego Fernando Dubeibe Marin, Anelise de Sarges Ramos, Eduardo Baía de Souza, Simone do Socorro Damasceno Santos, Nathália Nogueira da Costa, Otávio Mitio Ohashi e Thiago Velasco Guimarães Silva | |

Anormalidades morfológicas e danos no DNA espermático em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) submetidos à insulação testicular _____ 168

Arnaldo Algaranhar Gonçalves, Diego Fernando Dubeibe Marin, Thiago Velasco Guimarães Silva, Ana Júlia Mota de Lima, Mauro Andrey Rodrigues Moraes, Eduardo Baia de Souza, Dayana Neves de Melo, Sebastião Tavares Rolim Filho, Alexandre Rossetto Garcia e Otávio Mitio Ohashi

Novo protocolo para colheita de sêmen em crocodilianos _____ 172

Mônica Madrigal-Valverde, Olivier Castro Morales, Anthony Valverde, Stephen Jonhston, Arnaldo Gadea Rivas e Maicon Pereira Lents

Parâmetros reprodutivos de touros Nelore criados a pasto avaliados de 12 a 48 meses de idade _____ 176

Vicente Otávio da Fonseca, Clovis Franco Sousa, Nilson Antonio de Azevedo, Luigi Francis Lima Cavalcanti, Leticia Zoccolaro Oliveira, Gabriel Augusto Monteiro, Juliana Wilke Diniz Horta, Paloma Clemente Pinto da Silva, Ana Carolina Bahia Teixeira e Livio Ribeiro Molina

Leiomioma prostático em cão: relato de caso _____ 180

Kárita da Mata Fuchs, Rodrigo Freitas Bittencourt, Eduardo Luiz Trindade Moreira, Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Morgana Duarte Felix, Elton Amorim Romão, Gleice Mendes Xavier e Felipe da Silva Neri

Proporção de espermatozoides hiperativados em doses de sêmen descongeladas de bovino _____ 184

Ana Beatriz Marques de Almeida, Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo, Anne Kemmer Souza, Carlos Augusto Melanda, Luiz Guilherme Corsi Trautwein e Maria Isabel Mello Martins

Há influência das células rápidas identificadas pelo sistema CASA sobre a qualidade do sêmen descongelado de bovinos? _____ 188

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo, Ana Beatriz Marques de Almeida, Anne Kemmer Souza, Luiz Guilherme Corsi Trautwein, Carlos Augusto Melanda e Maria Isabel Mello Martins

Neoplasia testicular mista em cão: relato de caso _____ 192

Gleice Mendes Xavier, Rodrigo Freitas Bittencourt, Carmo Emanuel Almeida Biscarde, Catharina Albuquerque Vieira, Larissa Rodrigues Santana, Alessandro Bittencourt Nascimento, Morgana Duarte Félix, Adrielle da Silva Lima, Kárita da Mata Fuchs e Felipe da Silva Neri

Avaliação de precocidade sexual em touros jovens suplementados da raça Nelore _____ 196

Fernanda Battistotti Barbosa, Luiz Carlos Cesar Costa Filho, Ellen Caroline Soligo, Alini Silveira Peixoto, Tallita Silva de Assis Sales, Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo, Joana Carolina Trindade Barbosa, Marcos Vargas da Silveira e Eliane Vianna Costa e Silva

Ação da quercetina sobre a qualidade espermática de bovinos avaliados por microscopia eletrônica de varredura _____ 200

Stella Maris Teobaldo Tironi, Anna Raquel Grimas Almeida, Flávio August Vicente Seixas, Celso Vataru Nakamura e Antonio Campanha Martinez

Uso da quercetina como antioxidante na criopreservação de sêmen de touros *Bos indicus* _____ 203

Stella Maris Teobaldo Tironi, Anna Raquel Grimas Almeida, Flávio August Vicente Seixas, Gentil Vanini de Moraes e Antonio Campanha Martinez

Sazonalidade e qualidade de sêmen criopreservado de touros de diferentes genótipos em Centrais de coleta e processamento _____ 206

Tallita Silva de Assis-Sales, Fernanda Battistotti Barbosa, Joana Carolina Trindade Barbosa, Caroline Carvalho de Oliveira, Marcos Vargas da Silveira, Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo, Neimar Correa Severo e Eliane Vianna da Costa e Silva

Estudo da morfologia espermática de ovinos pantaneiros em diferentes estações sob sistema extensivo _____ 210

Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo, Daniela de Braga, Joana Carolina Trindade Barbosa, Fernanda Battistotti Barbosa, Tallita Silva de Assis, Marcos Vargas da Silveira, Fernando Alvarenga Reis e Eliane Vianna da Costa e Silva

Efeito de ambiente sobre a expressão da precocidade sexual em bovinos Nelore: dados preliminares _____ 213

Marcos Vargas da Silveira, Fernanda Battistotti Barbosa, Luiz Carlos Cesar da Costa Filho, Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo, Joana Carolina Trindade Barbosa, Tallita Silva de Assis, Willian Vaniel Alves dos Reis e Eliane Vianna da Costa e Silva

Comparison of three commercial dilutors in the freezing of dog semen: sperm motility in the equilibrium period _____ 217

Maitê Cardoso Coelho da Silva, Raiza Rocha Pereira, Gediendson Ribeiro de Araujo, Pedro Nacib Jorge Neto e Thyara de Deco-Souza

Efeito da curcumina na criopreservação do sêmen equino _____ 221

Raiza Rocha Pereira, Bianca Rodrigues Acacio, Bruno Gomes Nogueira, Bruno Milan, Lucas Kohl Lander, Pedro Henrique Pereira de Jesus, Juan Andrés Colman Arredondo, Breno Fernandes Barreto Sampaio e Willian Vaniel Alves dos Reis

Relação custo benefício do exame andrológico de touros _____ 225

Eliane Vianna da Costa e Silva

A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species _____ 228

Eduardo dos Santos Rossi, Gabriel Augusto Novaes, Bruno Rogério Rui, Daniel de Souza Ramos Angrimani, Luana de Cássia Bicudo, João Diego de Agostini Losano, Marcilio Nichi e Ricardo José Garcia Pereira

Palestras

III Reunião Anual da
ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

Patologias Clínicas Reprodutivas e Resultados de Tratamentos

Otávio Mitio Ohashi¹

E-mail: ohashi@ufpa.br

Simone do Socorro Damasceno Santos¹

Nathália Nogueira da Costa Almeida¹

Thiago Velasco Guimarães Silva²

Marcela da Silva Cordeiro³

Sebastião Tavares Rolim Filho⁴

Resumo: O objetivo desta revisão é fazer uma abordagem, mais prática do que acadêmica, sobre as patologias clínicas reprodutivas, principalmente, em touros bovinos e bubalinos, que podem ser encontradas durante a realização de um exame clínico andrológico. Apesar de sua importância para avaliar a capacidade reprodutiva do reprodutor, é bom salientar que a “pecuária moderna” está exigindo não somente um reprodutor que fertilize as vacas, mas também animais que assegurem o aumento da produtividade dos seus descendentes, tais como precocidade reprodutiva e produtiva (peso ao desmame, peso ao sobreano, resistência às doenças parasitárias e infecciosas, etc.). Baseado nesse princípio de associação de reprodução e produção, apresentaremos nesta revisão as patologias clínicas reprodutivas sob dois pontos principais que são: as patologias clínicas em que o reprodutor tem dificuldade em realizar a cópula (impotência coeundi) e as patologias clínicas em que o reprodutor tem dificuldade em fecundar a fêmea (impotência generandi).

Palavras-chave: Patologias clínicas reprodutivas, Impotência coeundi, Impotência generandi.

1 - Introdução

Na pecuária moderna, segundo Mee (2007) o veterinário deve deixar de ser o médico clínico do animal e passar a se envolver no controle de fertilidade do rebanho, onde diferentes fatores podem estar envolvidos. Portanto, o exame andrológico, o qual tem por objetivo unicamente avaliar a saúde reprodutiva do animal, na medida do possível, deve ser substituído pela SELEÇÃO ANDROLÓGICA, onde é levada em consideração, não só as patologias clínicas reprodutivas, mas também as características de produtividade (características quantitativas e qualitativas), bem como os problemas clínicos que não são da esfera reprodutiva, mas que podem afetar essa função, como por exemplo, problemas de aprumos e outros.

¹ Laboratório de Fecundação In Vitro, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

² Escola de Aplicação, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

³ Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará – Campus Ananindeua, Ananindeua, PA, Brasil.

⁴ Setor de Reprodução Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

Tendo em vista que a base do processo de seleção e melhoramento genético de um rebanho começa pela escolha de um bom reprodutor, ao selecionarmos reprodutores dentro desse contexto estaremos garantindo o aumento de produtividade do rebanho de forma quantitativa (número de animais) e qualitativa (melhoramento genético).

Baseado nesse princípio de associação de reprodução e produção, podemos classificar as patologias clínicas reprodutivas sob dois pontos principais que são: as patologias clínicas em que o reprodutor tem dificuldade em realizar a cópula (impotência coeundi) e as patologias clínicas em que o reprodutor tem dificuldade em fecundar a fêmea (impotência generandi).

A impotência coeundi é de fácil observação e diagnóstico, enquanto a impotência generandi é de difícil detecção e diagnóstico, especialmente se não temos histórico clínico-reprodutivo do animal, ou pelo menos do rebanho, o que é comum no tipo de manejo extensivo que predomina no Brasil. Por este motivo, quase sempre deixamos de realizar uma importante etapa do exame clínico, que é a realização de um criterioso exame semiológico geral e específico do animal (anamnese, inspeção, apalpação, etc.), que nos dará o necessário embasamento para se chegar a um diagnóstico clínico seguro.

1.1 Impotência Coeundi

Para diagnóstico das alterações que levam a dificuldade de efetuar a cópula, um exame semiológico adequado, na maioria dos casos, é suficiente para a obtenção do diagnóstico, raramente sendo necessária a coleta de amostras para exame laboratorial, por este motivo dizemos que esta alteração é de fácil observação e fácil diagnóstico. Listamos abaixo algumas dessas alterações que consideramos de maior ocorrência, adiantando que para a maioria das mesmas não é indicado tratamento, em função de que muitas dessas alterações são suspeitas de ter origem genética.

1.1.1 Libido Fraco ou Ausente

A libido é uma característica que muitos consideram de caráter genético (CHENOWETH, 1983; SARREIRO et al., 2002; SANTOS et al., 2004, HENRY & ECHEVERRI, 2013) e por este motivo deve ser uma das características avaliadas em testes de seleção de reprodutores, especialmente pelo fato de haver correlação genética positiva com parâmetros seminais como a concentração e motilidade espermática, fato observado por Sarreiro et al. (2002) em animais zebuínos, onde concluíram que, selecionar animais com boa libido resulta em selecionar animais com melhores parâmetros seminais.

Comparativamente aos taurinos, os animais zebuínos e bubalinos são considerados de “fraco” libido, entretanto, invariavelmente nos animais zebuínos nos quais essa característica foi avaliada, os animais foram colocados em condições estressantes de currais, em conjunto com outros reprodutores e sem adestramento prévio para colheita de sêmen, ou seja, sem levar em consideração que em zebuínos o temperamento agitado e a estratificação social dos animais podem influenciar nos resultados (SANTOS et al., 2004).

Em nossa pequena experiência, com animais da raça Nelore e especialmente com bubalinos, temos observado que os animais, mesmo adultos e com experiência de monta a campo, quando são adequadamente adestrados e muitas vezes “amansados” para a utilização de focineiras/cabresto para a colheita de sêmen por vagina artificial, realizam a monta em menos de um minuto, fato também observado em bubalino por Henry (2017) e Almeida (2018).

Além da questão genética, outros fatores parecem influenciar na libido, tais como a posição social no grupo (macho alfa), local estranho ao “território demarcado” ou de dominância (por este motivo devemos sempre levar a fêmea ao macho e nunca o macho à fêmea), baixo nível de andrógeno (fator genético?), fatores estressantes, índole do animal, etc. Apesar dessa alteração ser de fácil observação, a determinação do fator etiológico para a falta de libido é de difícil conclusão.

O tratamento para o fraco libido não é aconselhado em animais de produção, por ser uma característica de cunho genético. Entretanto, em animais de estimação (Ex. cão, equino, etc) para definição do tratamento, deve-se identificar a causa (HENRY & ECHEVERRI, 2013). Mas, tendo-se o diagnóstico de que a causa dessa condição é a baixa de testosterona, pode-se prescrever a aplicação de LH ou GnRH, que promoverão a liberação fisiológica endógena da testosterona, sabendo-se que podem ocorrer efeitos colaterais, como aumento da agressividade, queda de pelo, aumento a secreção das glândulas sebáceas, arritmia cardíacas, retenção hídrica, etc.

1.1.2 Problemas Físico-Clínicos que Influenciam na Capacidade Reprodutiva

Nas condições de manejo extensivo da maioria das fazendas, onde os animais precisam se deslocar por grandes áreas, muitas das vezes com topografia acidentadas, as avaliações clínicas são de fundamental importância, especialmente as relacionadas aos aprumos e cascos, onde é importante ter atenção no exame semiológico com o aprumo dos animais, como o jarrete reto, popularmente conhecido como “jarrete de frango”, bem como com às raças “pesadas” e com as raças mais sensíveis as condições ambientais da região, onde é comum o relato dos vaqueiros de que esses animais ficam “amoitados” (animais que ficam na sombra da vegetação) e não acompanham a movimentação do rebanho e, conseqüentemente, perdem o cio das vacas, não desempenhando o seu papel de reprodutor.

O tratamento é adequar o manejo as características da raça, pois muitas das raças “pesadas” foram selecionadas para as condições de manejo semi-intensivo a intensivo, entretanto, as características relacionadas ao aprumo, a qual parece ser de caráter genético, não é aconselhado o uso do animal como reprodutor.

Outras alterações, como a síndrome espástica, que se caracteriza por contrações musculares involuntárias especialmente dos músculos posteriores, bem como, problema na coluna vertebral podem dificultar a cópula, onde quase sempre o touro para realizá-la, começa apoiando-se com o queixo no posterior da vaca e só depois desloca o seu peso para os membros posteriores. A referida síndrome é de origem genética e afeta mais animais taurinos (WELLS et al., 1987; TENSZEN, 1998; GENTILI & TESTONI, 2006). Na literatura consultada, não encontramos citação de ocorrência desta síndrome em zebuínos.

Também por seu caráter genético, em animais de produção, deve-se evitar o uso do animal como reprodutor, mas em animais de estimação o tratamento é somente paliativo, já que esta alteração é progressiva e não tem cura.

1.1.3 Alterações do Pênis e Prepúcio que Levam a Impotência Coeundi

Afecções no pênis e no prepúcio também são fatores que dificultam a cópula e que através do exame semiológico é de fácil detecção e fácil diagnóstico. Há muitas publicações isoladas relatando ocorrências dessas alterações, mas há poucos dados “epidemiológicos” sobre esse assunto. Mas, uma extensa avaliação das alterações de prepúcio e de pênis foi realizada por Rabelo (2009), que examinou 12.320 touros, dos quais 898 (7,29%) apresentaram alterações nas estruturas citadas, sendo 728 (81%) de acropostite-fimose, 46 casos (5,20%) de desvio peniano, 23 (2,6%) de fibropapiloma na glândula, 14 (1,6%) de abscessos prepúciais e 11 (1,2%) de fraturas penianas.

Abaixo citaremos as alterações dessas estruturas de maior ocorrência, no rebanho brasileiro.

1.1.3.1 Acrobustite

A acrobustite é caracterizada pela inflamação da bainha prepúcial, onde o fator predisponente para essa afecção é a bainha pendulosa, característica de animais zebuínos, especialmente da raça Gir e Guzará, associado ao prolapso crônico da mucosa da referida bainha que é observado em alguns animais, o que é agravada, quando animais com essas características, são criados em pastagens mal manejadas com muitas plantas invasoras, popularmente conhecidas como “juquiras” e que propiciam a ocorrência de lesões na bainha prepúcial pendulosa.

O início da afecção começa como um processo irritativo-inflamatório do óstio prepúcial, na transição com a mucosa, que se não for tratada, pode evoluir uma ferida exsudato/ulcerativa, depois fibrose/necrose e fimose. Por esse motivo essa alteração, neste estágio, é também denominada como acropostite-fimose.

Os dados epidemiológicos são poucos, mas em 95 touros Nelores examinados, observou-se somente um caso de acrobustite (1,1%) (OHASHI et al., 1988) e em 24 animais guzerá observou-se 4 casos (16%) (dados não publicados), sendo que Rabelo (2009) após examinar 12.320 touros com alterações do pênis e prepúcio, observou que a acropostite-fimose foi a alteração de maior prevalência, com 741 casos (6,01%).

Por ser uma característica genética, durante o processo de seleção andrológica de zebuínos deve-se selecionar animais com menor bainha. Por questões estéticas, para diminuição da bainha prepúcial, pode-se fazer a correção cirúrgica da bainha, mas este procedimento é eticamente questionável, pois mascara a real característica reprodutiva do animal.

Com relação ao tratamento da acrobustite, se o problema é detectado no início, o tratamento tópico local com pomada cicatrizante associada a antibiótico, quando já houver processo infeccioso, é suficiente para regressão da alteração. Quando o processo é detectado

tardamente onde já há um processo inflamatório/infeccioso, inclusive com áreas de feridas e necrose na mucosa prepucial, o tratamento indicado é o cirúrgico, entretanto, deve-se levar em conta a relação custo-benefício. Para maior probabilidade de sucesso, o ato cirúrgico só deve ser realizado após o pré-tratamento para completa remissão do processo inflamatório/infeccioso da mucosa prepucial.

No site <http://www.cirurgia.vet.ufba.br/arquivos/docs/aulas/acrosbustite.pdf> há a descrição detalhada da correção cirúrgica da acrosbustite.

1.1.3.2 Desvio do pênis / pênis tortuoso

É uma enfermidade progressiva e de caráter degenerativo que ocorre em animais entre três a seis anos de idade (CALCIOLARI et al., 2016). É uma alteração relatada principalmente em touros em colheita de sêmen em central de inseminação artificial, em função de sua detecção ser mais fácil quando ocorre a exposição do pênis em ereção, fato de difícil observação ao nível de campo. Várias descrições são relatadas como pênis “torcido” (twisting penis), saca-rolhas (corkscrew penis), desvio ventral, desvio lateral (WALKER, 1980; MCENTEE, 1990).

Mas, segundo Rabelo (2009) que examinou especificamente alterações de pênis e prepúcio em 12.320 touros criados a campo, observou que o desvio de pênis foi a segunda alteração mais frequente, com 46 casos (0,37%), sendo a primeira a acropostite com 741 casos (6,01%). Temos observado essa condição em alguns touros quando expõe o pênis durante o processo de eletroejaculação, entretanto, achamos que isto pode ser um efeito “colateral” causado pelos estímulos elétricos inadequado da inervação/musculatura peniana. Alguns touros em ereção antes da cópula, ou durante a ejaculação apresentam o pênis em “saca-rolha”, mesmo que em colheitas anteriores não tenha apresentando essa alteração (MCENTEE, 1990), sendo que esse processo tem caráter progressivo, piorando o quadro com a idade (Walker, 1980).

Segundo Walker (1980) e Calciolari *et al.* (2016) esta afecção pode ser consequência de lesões traumáticas no pênis, dilacerações no corpo cavernoso, túnica albugínea, ligamento apical do pênis e prepúcio, as quais podem resultar em desvio peniano. Entretanto, em alguns casos suspeita-se ser de origem genética. O tratamento é a correção cirúrgica da área afetada.

1.1.3.3 Fratura do pênis

A fratura do pênis ocorre em função do tipo de cópula do bovino, onde há uma impulsão forte no momento da penetração peniana e se nesse momento houver um desvio ou erro na trajetória peniana, o mesmo pode dobra-se e ocorrer a fratura da túnica albugínea, localizando-se quase sempre na curvatura inferior do “S” peniano, com extravasamento de sangue e formação de coágulo e posterior aderência do pênis, dificultando a exposição do mesmo no momento da cópula.

Logo após a fratura pode haver edema prepucial, o que pode confundir e dificultar o diagnóstico. Se a fratura da túnica albugínea não for muito extensa, com pequena hemorragia e edema, o tratamento conservativo, inicialmente com duchas frias para diminuir a hemorra-

gia, mas depois de 48 horas, deve-se aplicar compressa morna ativar a circulação local e acelerar a remoção do edema. Caso a fratura seja extensa, com a formação de um grande coágulo no local, o tratamento indicado é o cirúrgico e logo após a formação do coágulo, antes de se formar aderência cicatricial, pois em casos em que já ocorreu o processo cicatricial, com forte aderência local, o prognóstico é menos favorável.

Outras alterações do pênis e que podem comprometer a cópula são: a aderência da mucosa da bainha prepucial ao pênis que está relacionado a animais jovens; de origem infecciosa, como por exemplo o fribropapiloma do pênis que é causado por vírus e o tratamento é a vacinação ou a autohemoterapia, a qual é considerada empírica, mas muito usado ao nível de campo; a persistência do frênulo do pênis, susteita-se ser de origem genética (WALKER, 1980) e portanto, deve-se evitar o uso do animal como reprodutor.

1.2 Impotência Generandi

Impotência generandi é a incapacidade do macho de fecundar o oócito, apesar de ocorrer a cópula e pode ser de origem adquirida ou genética. Várias causas estão envolvidas, onde com raras exceções, a maioria apresenta uma característica em comum que é a alta incidência de alterações na morfofisiologia espermática, dificultando o processo de fecundação, traduzindo-se clinicamente por diminuição da fertilidade do reprodutor. Estas alterações que afetam a viabilidade espermática só são diagnosticadas através do histórico e exame clínico andrológico criterioso, uma vez que podem ser originadas por afecções testiculares, epididimárias e das glândulas sexuais acessórias. Por este motivo dizemos que as causas de impotência generandi são de difícil observação clínica e de difícil diagnóstico.

Listaremos a seguir as principais alterações que levam a impotência generandi e de maior ocorrência no rebanho bovino brasileiro.

1.2.1 Degeneração Testicular

A Degeneração testicular é uma das causas mais frequentes que levam a problema de fertilidade no touro (GARCIA, 2017; GUIMARÃES, 2017, HENRY & ECHEVERRI, 2013; NASCIMENTO & SANTOS, 2011, MCENTEE, 1980). Não iremos discutir a etiopatogenia da degeneração, pois esses pontos já foram muito bem abordados recentemente por Guimarães (2017) e Celeghini et al. (2017), inclusive com abordagem diferente do processo degenerativo, onde a mesma pode ser utilizada como uma ferramenta para o controle farmacológico da contracepção em bovino (GARCIA, 2017). Devemos salientar que do ponto de vista clínico, a degeneração testicular se enquadra mais para uma síndrome do que para uma doença, uma vez que ela é consequência (sintoma) de diversos fatores, que vão desde alterações metabólicas, até fatores climáticos/ambientais, infecciosas e traumáticas, portanto deveríamos denominá-la de Síndrome da degeneração testicular.

No Brasil, onde predomina o clima tropical, a degeneração testicular é especialmente frequente em raças taurinas, as quais por serem oriundas de regiões de clima temperado, não se adaptam às condições climáticas da maioria das regiões brasileiras. Na região norte, onde

o clima é tropical e com alta umidade, observamos que em 95 touros Nelores examinados, a degeneração testicular foi diagnosticada em somente 4 animais (4,2%), sendo que em 29 touros da raça Holandesa, foi observado 21 animais (72,4%) com essa alteração, demonstrando a sensibilidade dos animais taurinos, bem como a termotolerância de animais zebruínos (Nelore) ao clima tropical (OHASHI et al., 1988), fato também observado por Duarte et al. (2005) e Kumi-Diaka et al. (1981).

Segundo Hansen (2004) essa termotolerância do zebu ao clima tropical é devido a menor taxa metabólica, bem como maior capacidade de dissipação do calor corporal da raça zebruína. Essa melhor capacidade de termoregulação dos zebruínos é também observada na região testicular e da bolsa escrotal, como demonstrado por Brito et al. (2004) que observaram que a parede da artéria testicular apresenta menor espessura em zebruínos do que em animais taurinos, isto permite maior proximidade com o sangue venoso do plexo pampiniforme, o que facilita a perda de calor do sangue arterial que entra no testículo, tornando a dissipação de calor ao nível testicular muito mais eficiente nesses animais.

Por outro lado, em animais taurinos, a maior distância entre o sangue da artéria testicular e do sangue venoso do plexo, dificulta a diminuição da temperatura do sangue arterial, o que parece explicar o fato de que em animais taurinos sob stress térmico, onde se observa a distensão máxima da bolsa escrotal, o mecanismo de termoregulação não é suficiente para evitar o stress térmico sobre o parênquima testicular (NICHI et al., 2006), permitindo a instalação do processo degenerativo do epitélio germinativo.

Devido o parênquima testicular estar submetido à intensa atividade metabólica, caracterizado pela ininterrupta divisão e diferenciação celular, predispõe o mesmo à influência de vários fatores que podem comprometer, em menor ou maior grau, a atividade espermatogênica, o que se traduz em alterações clínicas testiculares e do quadro espermático, que dependendo da gravidade, indica se a degeneração é leve, moderada ou grave.

Em bovinos, em geral observa-se aumento da patologia espermática, com prevalência principalmente das patologias de cabeça, indicando alteração na atividade espermatogênica. Dependendo do fator etiológico, pode ocorrer também a alta incidência de patologias de cauda e gota citoplasmática proximal, indicando comprometimento também da atividade epididimária.

Em bubalinos submetidos à insulação escrotal, o quadro espermático apresenta pequena elevação nos níveis de patologias de cabeça, mas aumento significativo nas patologias de cauda e gota citoplasmática proximal (GARCIA, 2009; GONÇALVES ET AL., 2017) indicando que no búfalo parece ser o epidídimo a região mais afetada pela insulação, ao contrário da espécie bovina onde pode ocorrer também envolvimento do epidídimo, mas com maior alteração ao nível testicular (BRITO et al. 2004). Ou seja, o quadro espermático em processo de degeneração testicular em bubalino parece ser diferente do bovino, porém ainda são necessários mais estudos para confirmação dessa observação.

Em animais taurinos, os quais são sensíveis às condições de clima tropical, a principal causa de degeneração é a alta temperatura, portanto nestes casos, o tratamento é preventivo,

ou seja, evitar criar esses animais em regiões que apresentam condições desfavoráveis às características da raça.

Em animais zebuínos, os quais são termotolerantes e poucos afetados pelo clima tropical, observamos que entre as principais causas do processo está o desequilíbrio nutricional, onde o excesso (alto nível de proteína na alimentação, acima de 15%), ou a deficiência, especialmente de minerais e vitaminas A e E podem afetar o metabolismo animal e, como consequência, predispor ao processo degenerativo testicular. No primeiro caso, a diminuição do nível de proteína na alimentação corrige o problema e no segundo caso, do mesmo modo, deve-se fazer a correta mineralização e a suplementação com fontes de beta-caroteno. Não custa lembrar que ração que apresenta na sua composição torta de algodão, não deve ser administrada para reprodutores, devido a presença do gossipol, o qual é nocivo para a espermatogênese (GADELHA et al., 2011).

Na Central de Biotecnologia de Reprodução da Universidade Federal do Pará, localizada no estado do Pará, região com alta temperatura ambiental, em alguns reprodutores taurinos que se apresentaram como doadores de sêmen, e que ao exame clínico-andrológico foi constatado que os mesmos apresentavam-se com degeneração testicular provocado pelo stress térmico, tivemos que mantê-los em baias refrigeradas para remissão do processo e obtenção de sêmen de qualidade para o processo de criopreservação, com excelentes resultados. Entretanto, em animais que já estavam em processo avançado de stress térmico, ou seja, com relaxamento total da bolsa escrotal e sem resposta reflexa de contração do músculo cremaster ao estímulo frio (água fria) ou ao caminhar, o procedimento da baia refrigerada não mais produzia a remissão do processo.

Em alguns casos em que há lesão traumática do túbulo seminífero e extravasamento de espermatozoides para o parênquima testicular, ocorre a deposição de minerais sobre os mesmos, levando ao processo conhecido como “calcificação” (MCENTEE, 1980), alteração que geralmente é restrita a área lesionada (focal) e não difusa como na fibrose. Caso a etiologia do processo degenerativo não seja corrigido, o parênquima testicular será substituído gradativamente por tecido conjuntivo, momento em que a consistência testicular apresenta rigidez à palpação, caracterizando a fibrose testicular, que é fase final do processo degenerativo.

A degeneração testicular, embora seja uma das mais importantes causas de infertilidade masculina, até o momento não foi estabelecido um tratamento eficiente e de alta repetibilidade (ALVES ET AL., 2016). Por se tratar de uma síndrome, a identificação do fator etiológico e a sua remoção ainda é a decisão mais indicada e, dependendo do estágio da lesão, suficiente para a remissão do processo degenerativo.

1.2.2 Hipoplasia Testicular

A Hipoplasia testicular clássica, por seu caráter genético, é de fundamental importância que a mesma seja diagnosticada de forma correta e segura, especialmente no caso de hipoplasia parcial, para se evitar a difusão no rebanho. Não encontramos muitos dados de sua prevalência em animais zebuínos, onde em 80 touros Nelore foi observada a ocorrência de 1 caso (1,1%) de hipoplasia total bilateral (OHASHI et al., 1988), sendo que na raça Gira pós examinar 311

animais foram diagnosticados 18 (5,79%) casos de hipoplasia testicular, constituindo-se como o principal distúrbio reprodutivo detectado no rebanho em questão (MOURA, 2013).

A ocorrência dessa anomalia no rebanho bubalino nacional já foi descrita por Ohashi et al. (1988, 1995, 1997), Vale e Ribeiro (2009) e Barbosa et al. (2010), bem como em outros países por Kaikini e Patil, (1978), Kodagali et al. (1980) e Khan et al. (1991). Em um estudo das ocorrências de anomalias testiculares de bubalinos mestiços abatidos em matadouro, foram observados dois casos (0,62%) de hipoplasia testicular de 319 animais examinados (OHASHI et al., 1995). Em rebanho puro da raça Murrah, Vale e Ribeiro (2009) examinaram 123 touros e encontraram 11 (8,94%) animais com a hipoplasia testicular, salientando que esta alta incidência deve-se à reprodução consanguínea à qual o rebanho era submetido. Em um estudo da prevalência das anormalidades reprodutivas de búfalos da região amazônica, Barbosa et al. (2010) examinaram 305 reprodutores e encontraram 74 com problemas testiculares, sendo que 12 (3,93%) eram de hipoplasia testicular.

A etiologia da hipoplasia é um gene autossômico, recessivo de penetrância incompleta (ERIKSSON, 1942 apud SETTERGREN & GALLOWAY, 1965). Apesar da etiologia estar definida desde a década de 40, não encontramos na literatura consultada citação da identificação de um gen relacionado a esta afecção, o que ajudaria na identificação de animais portadores da patologia e sua eliminação do processo reprodutivo. Embora Moura (2013) tenha observado que touros Gir com hipoplasia testicular apresentaram maior número de cópias do gen TSPY (*testis-specific protein Y-encoded*) que animais clinicamente normais.

Por ser de origem genética não há tratamento para essa anomalia e a sugestão é a retirada do animal do processo reprodutivo.

1.2.3 Disfunção do Epidídimo

A Disfunção do epidídimo caracteriza-se pela alta incidência de patologias da cauda e baixa motilidade espermática. O diagnóstico é confirmado pelo teste de exaustão que consiste em realizar várias colheitas de sêmen no menor tempo possível onde será observada queda nas patologias de cauda e aumento da motilidade espermática. Sua ocorrência foi descrita pela primeira vez na Suécia em bovino taurino por Gustafsson (1966) e em zebuínos no Brasil, por Vale Filho (1975).

Em bubalinos, essa anomalia foi descrita por Ohashi et al. (1997), a qual foi confirmada através de dois testes de exaustão, onde se obteve, no período de 90 minutos, cinco e seis ejaculados, respectivamente. Em ambos os testes, houve melhora na taxa de motilidade e queda no nível de anomalia de cauda espermática, quadro característico de disfunção do epidídimo. Por ser de origem genética, não há tratamento e o animal portador dessa alteração não deve ser utilizado como reprodutor.

1.2.4 – Vesiculite Seminal

A inflamação das glândulas vesiculares, cujo fator etiológico pode ser bactérias, vírus, fungos e protozoários, apresenta maior ocorrência em touros jovens quando criados juntos,

principalmente, devido a prática da atividade homossexual (BICUDO et al., 2007). É uma importante causa de problema reprodutivo em touros, cuja ocorrência descrita por Ohashi et al. (1988) em animais da raça Nelore foi de 3 (3,2%) de 80 animais examinados.

Com relação ao tratamento de vesiculite por causa bacteriana, segundo McAuley (1980), mesmo com tratamento prolongado com antibiótico, o prognóstico em geral não é bom. Entretanto, no Canadá, em animais taurinos de 9-12 meses de idade, Rovay et al. (2008) observaram esta alteração em 4.4% (97/2207) dos animais examinados, sendo que em 77,3% (75/97) desses animais houve recuperação espontânea (sem tratamento). Segundo os referidos autores, isto pode ter ocorrido devido ao fato de que em alguns animais jovens pode ocorrer o refluxo de sêmen e urina para dentro da glândula vesicular, desencadeando um processo inflamatório, sem necessariamente ocorrer infecção bacteriana e deste modo favorecer a cura espontânea. Em 48 animais com vesiculite, em que identificaram infecção bacteriana e após a realização do antibiograma, foi realizado tratamento durante seis dias com Tilmicosina e Tulathromycina, sendo que a taxa de recuperação foi maior nos animais tratados com Tulatromicina (88% = 22/25) do que nos tratados com Tilmicosina (11/23 = 48%). Em função da dosagem recomendada nem sempre chegar em níveis adequados a vesícula seminal, sugeriram que a dose deve ser o dobro da recomendada, pois deste modo a concentração do antibiótico chega à glândula afetada em níveis adequados ao combate da bactéria.

No início da década de 90 detectamos em um touro Nelore, um processo agudo afetando a vesícula direita, onde através de apalpação retal foi detectado aumento da vesícula seminal com alta sensibilidade ao toque e pelo exame do sêmen foi observado flocos de pus. O exame sorológico para brucelose foi negativo. Não foi feito o isolamento e identificação bacteriana da vesiculite, mas foi realizado o tratamento a base de cloranfenicol, com aplicação a cada 48 horas, durante duas semanas, onde ao final do tratamento não foi mais observado a presença de pus e leucócitos no ejaculado, indicando remissão do processo, entretanto, a vesícula direita à apalpação apresentava-se com áreas de fibrose.

Em cinco equinos com vesiculite bacteriana, após o antibiograma, Silva (2014) realizou tratamento local com 30-60ml de solução contendo antibiótico, por 10 dias seguidos, onde observou melhora nos primeiros dias, mas após 30 dias ocorreu recidiva em todos os animais, indicando que neste experimento, o método de tratamento local não foi eficiente para resolução da vesiculite.

Em bubalinos, nosso grupo de pesquisa já realizou centenas de exames andrológicos e até o momento não foi observado nenhum caso de vesiculite seminal.

1.2.5 Outras patologias clínicas reprodutivas

Neste trabalho foram discutidas as patologias reprodutivas que consideramos de maior importância e ocorrência no rebanho brasileiro, embora outras patologias possam afetar o rebanho como as Neoplasias testiculares, que segundo Nascimento e Santos (2011) são mais frequentes em cães e touros velhos, mas quase sempre são tumores benignos e unilateral e por este motivo a orquiectomia do lado afetado resolve o problema. Salientamos que para

as alterações de natureza genética, como por exemplo Criptorquidismo e Aplasia testicular que já foram descritas em búfalo por Chaudhuri et al. (1982) e Ohashi et al. (1995), é contraindicado qualquer tipo de tratamento.

Além dos distúrbios clínicos reprodutivos, atualmente com o uso mais intensivo e observação mais criteriosa de sêmen de touros em programas de Inseminação Artificial em tempo fixo (IATF) e em programas de produção *in vitro* de embriões (PIVE), tem sido observada variação individual na taxa de concepção entre touros e também entre partidas do mesmo animal (Sá Filho, 2012; Oliveira, 2012). Em tese, os ejaculados dos animais utilizados nesses programas são submetidos à análise de qualidade do sêmen e análise morfológica dos espermatozoides (espermiograma) para sua liberação e uso, entretanto, apesar do inegável valor dessas avaliações as mesmas não tem sido suficientes para explicar as diferenças nas taxas de fecundação, demonstrando a necessidade de análises mais específicas, especialmente sobre a integridade ao nível molecular das células espermáticas como fragmentação do DNA, análise da protaminação e de marcadores bioquímicos (receptores para heparina, ácido hialurônico, etc.) visando a melhor compreensão da capacidade fecundante dos espermatozoides (Oliveira, 2012). Do mesmo modo que as alterações morfológicas dos espermatozoides, também é inegável o valor das análises moleculares espermáticas, entretanto o real valor de prognóstico dessas análises moleculares sobre a fertilidade do animal ainda precisa ser analisado com cautela, uma vez que, Beck-Fruchter et al. (2016) realizaram uma meta-análise de trabalhos publicados em humanos submetidos ao processo de fecundação *in vitro* e concluíram que a avaliação de receptores para ácido hialurônico não apresentou influência na taxa de fecundação.

2 – Considerações Finais

As patologias do pênis, apesar de sua alta ocorrência, talvez pela dificuldade de expô-lo, quase sempre são negligenciadas durante o exame clínico-andrológico. Por este motivo, é importante salientar a necessidade de um exame semiológico criterioso durante o processo de seleção andrológica de um reprodutor.

Em bovinos, por ser um animal de produção, onde a relação custo/benefício é importante, não encontramos significativos avanços em relação aos tratamentos das principais afecções do trato reprodutivo do touro, mesmo porque muitas delas são de natureza genética. No entanto, se não avançamos no tratamento, poderíamos ter avançado na prevenção, especialmente com as patologias de cunho genético, com o uso da análise genômica, visando a identificação de genes ou marcadores moleculares relacionados às alterações reprodutivas de cunho genético, permitindo o controle na difusão das mesmas, mas do mesmo modo, na veterinária, avanços nessa área tem sido pouco explorado.

Por outro lado, a genética quantitativa (mendeliana) e a genética qualitativa (genômica) avançaram muito nestes últimos anos em relação às características de produtividade, tanto na pecuária de leite, como também na de corte, permitindo selecionar reprodutores com bases científicas sólidas, que seguramente irão melhorar a produtividade do rebanho.

Bibliografia

- ALMEIDA, J. Sêmen refrigerado e seu potencial de uso na inseminação artificial na búfala (*Bubalus bubalis*). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária da UFMG. Tese de Doutorado. 2018. 192p.
- ALVES, M.B.R.; ARRUDA, R.P.L.B.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; OLIVEIRA, B.M.M.; TORRES, M.A.; RAVAGNANI, G.M.; LANÇONI, R.; ALMEIDA, T.G.; STORILLO, V.M.; VELLONE, V.S.; FRANCI, C.R.; THOMÉ, H.E.; CANELLA, C.L.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C. Low-level laser therapy to recovery testicular degeneration in rams: effects on seminal characteristics, scrotal temperature, plasma testosterone concentration, and testes histopathology. *Lasers Med Sci*, 31:695–704, 2016.
- BARBOSA, E.M.; RIBEIRO, H.F.L.; ROLIM FILHO, S.T.; FERREIRA, R.N.; GARCIA, O.S.; AYALA, H.D.M.; VALE, W.G. Prevalence of reproductive abnormalities in the buffalo genital tract in Amazon Region, Brazil. *Rev Vet*, v.21, suppl.1, p.955-957, 2010.
- BECK-FRUCHTER, R.; SHALEV, E.; WEISS, A. Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 32, 286–298, 2016.
- BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F; BARBOSA, R.T; KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 61: 511–528. 2004.
- CALCIOLARI, K.; BARROCO, V.; GRAVENA, K.; CANOLLA, P.A. Principais doenças prepuccias e penianas em bovinos. *Investigação*, 15(4):83-90, 2016.
- CELEGHINI, E.C.C.; ALVES, M.B.R.; OLIVEIRA, B.M.M.; BATISSACO, PINTO, L.; S. C.C.; GONZAGA, V.H.G.; NOGUEIRA, V.J.M.; GARCIA-OLIVEROS, L.N.; ALMEIDA, F.S. Degeneração testicular: visão científica. *Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)*, 2017.
- CHENOWETH, J. Sexual Behavior of the Bull: A Review. *Journal of Dairy Science*; Volume 66, Issue January 1983, Pages 173-179.
- COLLINS, J.A.; BARNHART, K.T.; SCHLEGEL, P.N. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertility and Sterility*, Vol. 89, No. 4, April 2008.
- DUARTE, A.M.; DINIS, E.G.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; TAVARES, M.; MAITIN, R.E.C.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Associação entre temperatura e características do sêmen de touros Nelore, Gir e Holandes criados à campo. *Bioesc. J. Uberlândia*, 21(1):175-182, 2005.
- FERNANDES, C.E., DODE, M.A.N. PEREIRA, D., SILVA, A.E.D.F. Effects of scrotal insulation in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 70: 1560–1568, 2008.
- GADELHA, I. C.N., RANGEL, A. H.N., SILVA, A.R., SOTO-BLANCO, B. Efeitos do gossipol na reprodução animal. *Acta Veterinaria Brasileira*, v.5, n.2, p.129-135, 2011.
- GARCIA, O.S. Estudo experimental da insulação testicular em bubalinos. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal –Universidade Federal do Pará. 2009. (Dissertação de Mestrado)
- GARCIA, AR. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema? *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.41, n.1, p.33-39, jan./mar. 2017.
- GENTILI, A. & TESTONI, S. Inherited disorders of cattle: a selected review. *Slov. Vet. Res.*, 43(1): 17-29, 2006.
- GONÇALVES, A.A., SILVA, T.V.G., SOUZA, E.B., DE MELO, D. N., ROLIM FILHO, S.T., GARCIA, A.R., OHASHI, O.M. Influência da insulação testicular em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) e mudanças no padrão da morfologia espermática. *Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)*, p 154-157, 2017.
- GUIMARÃES, J. D. Exame do potencial de fertilidade de touro: apto ou inapto à reprodução é suficiente? *Anais da 2ª Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal (ABRAA)*, 2017.

- GUSTAFSSON, B. Luminal contents of the bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. *Acta Veterinaria Scandinavica*, supplement 17, 1966.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Animal Reproduction Science*, 82-83:349-360, 2004.
- HENRY, M. & ECHEVERRI, A.M.L. *Andrologia Veterinária Básica*. Edição Universidade Federal de Minas Gerais. Centro de apoio ao Ensino a Distância. Escola de Veterinária da UFMG. 193p. 2013.
- HENRY, M., BRITO, M.F.; NEVES, B.P.; AULER, P.A.; ALMEIDA, J.; ANDRADE, G.O.; BECERRA, V.B.; BECERRA, L. B., V.B.; BERGMANN, L. Peculiarities of the buffalo species for andrological evaluation – results of four years of study and weekly semen collection schedule. *Animal Reproduction*, v.14, (Supl.1), p.1225-1233. 2017.
- <http://www.cirurgia.vet.ufba.br/arquivos/docs/aulas/acrosbustite.pdf>
- KAIKINI, A.S. & PATIL, R.K. Studies on genital malformation in Berari (Nagpuri) buffalo bulls. *Indian J. Anim. Sci.* 48(6):411-413, 1978.
- KHAN, I.H, CHAUNDHRY, R.A, ANZAR, M., BAJWA, M.A. Studies on causes of infertility in male Nili-ravi Buffalo. *Buffalo Bull*, v.10, p.51-57, 1991.
- KODAGALI, S.B. BHAVSAR, B.K., KAVANI, F.S. Age and reasons for disposal of A.I buffalo bulls. *Indian J. Anim. Health*, 19(1):31-34, 1980.
- KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAN, J.S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. *Vet Rec*.108(1):13-5. 1981.
- LIN, MING-HUEI; LEE, R. KUO-KUANG; LI, SHENG-HSIANG; LU, CHUNG-HAO; SUN, FANG-JU; HWU, YUH-MING. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertility and Sterility*, Vol. 90, No. 2, August 2008.
- MCENTEE, K. Reproductive Pathology of Domestic Mammals. *Academic Press*. London, 401p. 1990.
- MCAULEY, A.D. Seminal vesiculite in bulls. In: Morrow, D. *Current therapy in theriogenology*. Ed. W.R Saunders, Philadelphia, London. 1980. 695p.
- MEE, J.F. The role of the veterinarian in bovine fertility management on modern dairy farms. *Theriogenology*, 68:257-265, 2007.
- MOURA, G.S. Estudo clínico-andrológico e genético-molecular da subfertilidade em touros da raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*) no Estado de Minas Gerais. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Escola e Veterinária da UFMG. 2013. Tese de Doutorado.
- NASCIMENTO, E.F. & SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos animais domésticos**. 3ª. Ed.; Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 153p. 2011.
- NICHI, M.; BOLS, P.E.J.; ZU"GE, 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* 66: 822-828, 2006.
- OHASHI, O.M., SOUSA, J.S., RIBEIRO, H.F.L., VALE, W.G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *Bos taurus* e mestiços, criados em condições de clima Amazônico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 8(1/2):31-35, 1988.
- OHASHI, O.M.; VALE, W.G.; SOUSA, J.S.; SILVA, A.O.A. Disturbance of testicular development n buffaloes (*Bubalus bubalis*): Hypoplasia and aplasia. *Buffalo Journal*, v.1, p.97-101, 1995.
- OHASHI, O.M. Anomalias de origem genética observadas no rebanho bubalino nacional. In: Simpósio Brasileiro de Bubalinocultura, Cruz das Almas, BA. **O búfalo no Brasil**. UFBA/Escola de Agronomia, p.155-164, 1997.
- OLIVEIRA, L.Z. Utilização de diferentes touros na iatf: características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Jaboticabal. 2012. Tese de Doutorado.

RABELO, R.E. Desvio traumático de pênis em bovinos: aspectos epidemiológicos, morfofuncionais e tratamento cirúrgico empregando biomateriais. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Escola de Veterinária da UFGO. Tese de Doutorado. 102p. 2009.

SÁ FILHO, M.F. Efeito individual de touros em programas de IATF: Realidade e estratégias para evitar baixos resultados. **Site:** <http://www.mastergenetics.com.br/wp-content/uploads/2012/05/Efeito-individual-de-touros.pdf>, 2012.

SANTOS, M.D., TORRES, C.A.A., RUAS J, R.M., SILVA FILHO, J.M., COSTA, E.P., PEREIRA, J.C.. Teste da libido e atividade de monta em touros da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**, v.56, n.4, p.504-510, 2004.

SARREIRO, L.C., BERGMANN, J.A.G., QUIRINO, C.R., PINEDA, N.R., FERREIRA, V.C.P., SILVA, A. Herdabilidade e correlação genética entre perímetro escrotal, libido e características seminais de touros Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootecnia**. vol.54 no.6 Belo Horizonte Dec. 2002.

SETTERGREN, I. & GALLOWAY, D.B. Studies on genital malformation in female cattle using slaughterhouse material. **Nord. Vet. Med.** 17:9-16, 1965.

SHARIF, K. Sperm DNA fragmentation testing: To do or not to do? **Middle East Fertility Society Journal**, 18: 78-83, 2013.

TENSZEN, A. Spastic syndrome in a Canadian Hereford bull. **Can Vet J**: 39: 716-717, 1998.

VALE FILHO, V.R. Disfunção de epidídimo em touros *Bos taurus* e *Bos indicus* criados no Brasil. Belo Horizonte, UFMG, 1975. 82p (Dissertação Mestrado)

VALE, W.G. & RIBEIRO, H.F.L. Inheritance causes of buffalo bulls infertility in Brazil. **Buffalo Newslett**, n.24, p.3-9, 2009.

WALKER, D. Genital surgery of the bull. In: Morrow, D. Current therapy in **Theriogenology**. Ed. Saunders Company, London. 685p. 1980.

WELLS, G. A. H., S. HAWKINS, A. C., O'TOOL, T., DONE, H., DUFFELL, S. J., BRADLEY, N. D., HEBERT, C. N. Spastic Syndrome in a Holstein Bull: A Histologic Study. **Vet. Pathol.** 24:345-353, 1987.

Afecções reprodutivas e sua influência na fertilidade do garanhão

Gabriel Augusto Monteiro¹
monteiroga@yahoo.com.br

Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva²

Juliana Horta Wilke Diniz¹

Deborah Freitas Silva¹

Abstract: The identification of the mechanisms responsible for male infertility is challenging, due to the innumerable processes that impair the production of gametes and copulation. Among them, the conditions that affect the testis, epididymis, scrotal sac, sexual glands, penis, foreskin and those that interfere with erection and ejaculation are highlighted. The present work aims to review the main reproductive disorders that affect the equine male and to present its diagnostic methods and treatment.

Palavras-chave: equino, subfertilidade, testículo.

Keywords: equine, subfertility, testicle.

Introdução

A redução da fertilidade no garanhão resulta em importantes perdas econômicas para a indústria equina. Diferente de outras espécies domésticas, a seleção genética dos reprodutores 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, há uma grande variedade de anormalidades reprodutivas encontradas comumente nesses indivíduos que agem negativamente na fertilidade, devido ao impacto significativo sobre a espermatogênese, enquanto outras resultam na incapacidade do garanhão realizar a cópula. Um diagnóstico preciso da patologia promove grande ajuda no tratamento, e auxilia na formação de um prognóstico para a futura fertilidade.

Afecções testiculares

Degeneração testicular

A degeneração testicular (DT) é a enfermidade mais frequente e que mais contribui para a infertilidade dos machos mamíferos terrestres, incluindo o garanhão. Ela é caracterizada

¹ Laboratório de Reprodução Animal (REPRAN), Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

² Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – UFV

pela deterioração do parênquima testicular, com conseqüente perda de sua função [1]. Isso se deve ao fato do epitélio seminífero possuir um metabolismo lento e extremamente sensível às adversidades externas e internas. Dessa forma, para que o testículo desempenhe todas as suas funções de forma adequada é necessária a manutenção deste órgão de 3 a 4° C abaixo da temperatura corporal [2,3].

A DT pode se desenvolver de forma bi ou unilateral a partir de causas adquiridas ou idiopáticas. As primeiras se originam de causas conhecidas e as segundas parecem estar relacionadas à idade, e não apresentam causa aparente [4]. Diversos fatores etiológicos podem resultar em DT adquirida, incluindo estresse térmico ambiental, estresse térmico escrotal, inflamações e infecções no escroto ou em seus componentes, febre, trauma, neoplasias, torção testicular, hérnia ínguino-escrotal, exposição a toxinas, distúrbios endócrinos, deficiências nutricionais e tratamentos medicamentosos, especialmente com esteroides antiinflamatórios e anabólicos [5,6]. Dentre todas as causas conhecidas, alterações que conduzem o testículo à perda da homeostase térmica são as mais frequentes [7].

O diagnóstico da DT geralmente é baseado no exame físico — incluindo a inspeção e palpação testicular — na avaliação seminal, além de especial atenção ao histórico clínico geral e reprodutivo do animal [1,5]. Uma anamnese completa é necessária antes que se possa fazer um diagnóstico de DT, uma vez que tanto clinicamente como histologicamente esta condição é indistinguível da hipoplasia testicular [4,8]. O diagnóstico definitivo é baseado no exame histopatológico da biópsia, que normalmente não é necessária e pode gerar complicações como o desencadeamento de autoimunidade [9].

Na fase aguda do processo o testículo degenerado se apresenta tumefeito e com consistência macia à palpação. Em seguida ocorre uma diminuição paulatina do tamanho, caracterizada por atrofia e flacidez [4]. Com a progressão da degeneração e da atrofia gonadal, a flacidez vai dando lugar ao enrijecimento do tecido testicular e, à medida que o processo se cronifica, os epidídimos tornam-se mais proeminentes e desproporcionais em relação à gônada [10]. O decréscimo da motilidade e concentração espermática e o incremento do número de espermatozoides morfológicamente anormais, representam bons indicativos do processo de DT. Com o agravamento do processo, o ganhão pode se tornar oligo ou azoospermico e se observa células germinativas e células gigantes multinucleadas no ejaculado [5,10,11].

O prognóstico da DT é determinado pelo tempo de permanência e gravidade do insulto, de forma que quanto antes o agente causal for removido, maiores as chances do tecido testicular se recuperar completamente [4]. As espermatogônias-tronco são mais resistentes aos insultos tóxicos e térmicos do que as demais linhagens espermáticas. Dessa forma, essas células permitem um restabelecimento da espermatogênese, dando origem a espermatozoides saudáveis no sêmen em aproximadamente 70 dias após, a remoção da causa da DT [12]. Novos tratamentos têm sido propostos para DT, como: terapias de suporte mediante suplementação oral com nutracêuticos contendo vitaminas, aminoácidos e minerais essenciais à espermatogênese; uso de pentoxifilina; e células-tronco. Os resultados ainda que promissores, ainda estão em fases experimentais ou de publicação [13].

Criptorquidismo

Criptorquidismo é uma condição hereditária relativamente comum, tendo prevalência de 2 a 8% em garanhões. Esta condição é caracterizada pela falha na descida testicular para sua localização normal [14,15]. Nos mamíferos, a descida testicular é resultante do inchaço e regressão do gubernáculo. A tração exercida pelo inchaço da porção extra-abdominal do gubernáculo e sua subsequente regressão puxa o testículo para dentro do canal inguinal [16].

A causa da alta taxa de criptorquidida em cavalos não está completamente entendida, no entanto, acredita-se que esteja relacionada com anomalias congênicas ou deficiência em produzir peptídeo tipo insulina [15], testosterona ou seus receptores em tempo hábil [17]. Algumas raças possuem maior prevalência criptorquídicos (Quarto de milha, Percheron e Pôneis) demonstrando indícios do componente genético ao desenvolvimento da condição [18]. Esta hipótese é sustentada por trabalhos que relataram onze variações de cópia de DNA encontradas exclusivamente em criptorquidismo bilateral [19].

A retenção testicular unilateral é mais comum que a bilateral. Animais criptorquídeos bilaterais são estéreis devido à supressão térmica da espermatogênese, ao passo que os criptorquídeos unilaterais possuem espermatogênese normal no testículo não afetado, portanto geralmente são férteis [16]. Os níveis plasmático de testosterona em criptorquídicos apresentam-se inferiores a garanhões reprodutores [20], similares aos garanhões não reprodutores e superiores aos equinos castrados [21]. Histologicamente, os testículos retidos possuem túbulos com poucas ou nenhuma células germinativas [22].

O diagnóstico da criptorquidida é baseado no histórico completo, ultrassonografia ou exame físico, medição de níveis do hormônio anti-Mülleriano [23], testosterona e sulfato de estrona, antes e após a estimulação com gonadotrofina coriônica humana [14]. A orquiectomia bilateral é o principal tratamento utilizado pelo possível caráter hereditário do criptorquidismo em equinos [24], entretanto, tratamentos hormonais com hCG e GnRH podem ser utilizados com variáveis taxas de sucesso [25].

Neoplasia testicular

As neoplasias testiculares são relativamente raras nos equinos [26], sendo na maioria dos casos, imperceptíveis na palpação da região escrotal. Isso ocorre porque algumas neoplasias estão associadas à patologias como a degeneração testicular, que leva à regressão do tamanho do testículo (27). Sendo indispensável a utilização do exame ultrassonográfico para diagnóstico e acompanhamento da evolução dos casos.

Fatores como idade e criptorquidismo, são condições predisponentes no desenvolvimento dessas afecções. A maioria dos tumores encontrados são originados de células especializadas que compõem o parênquima testicular. Em vista disso, a classificação é baseada na célula de origem: tumores originados das células de Leydig são denominados leydigocitoma; Sertolioma, o das células de Sertoli e seminoma aqueles originados do epitélio germinativo [28]. Dentre esses, o tumor mais comumente encontrado em equinos é o seminoma [29].

O seminoma caracteriza-se macroscopicamente por aumento de volume do testículo, com formações nodulares esbranquiçadas, moles e com pouca resistência à palpação. Histologicamente, são subdivididos nas formas intratubular e difusa, apresentando infiltrado linfocitário multifocal no interstício (30).

Os tumores testiculares frequentemente causam quadro de infertilidade em homens e animais. Em estudo feito 54 homens com seminoma, apenas 22% apresentaram contagem superior a 10 milhões de espermatozoides por ml e 30% de motilidade, esse estudo confirma que a maioria dos pacientes com tumores testiculares são severamente oligozoospermicos [29]. Homens inférteis com análises anormais de sêmen têm 20 maior incidência de câncer testicular em comparação com a população, e o tumor de células germinativas é o que tem maior frequência [28]

No exame ultrassonográfico os tumores normalmente são visualizados como estruturas heterogêneas localizadas no parênquima testicular, normalmente muito homogêneo [27].

Em todos os casos em que o exame de palpação ou ultrassonografia levam à suspeita de neoplasias testiculares, o diagnóstico definitivo deve basear-se nos exames citológicos ou histopatológicos. A recomendação para os casos de tumores testiculares é a orquiectomia do testículo neoplásico, evitando assim a disseminação da doença e comprometimento do testículo contralateral. A recuperação da espermatogênese no testículo contralateral, nos casos em que este foi degenerado, vai depender do tempo de duração e do grau da degeneração.

Inflamação do testículo, epidídimo e bolsa escrotal

A inflamação do testículo, epidídimo e bolsa escrotal é denominada respectivamente de orquite, epididimite e periorquite. Elas podem ocorrer de forma concomitante ou individualmente e são causadas na maioria das vezes por infecções bacterianas, como por *Streptococcus zooepidemicus* e *Proteus mirabilis* [6]. Em nossa experiência infecções ascendentes secundárias à vesiculite seminal e ampolites são ainda mais frequentes, causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* A inflamação dos componentes escrotais pode ainda ocorrer de forma secundária a traumas, parasitas (*Strongylus oedentatus*) e doenças autoimunes [31,32].

Clinicamente os animais apresentam aumento da região escrotal, hipertermia local e sensibilidade dolorosa ao toque, e podem apresentar sinais sistêmicos como depressão, anorexia, sinais leves de cólica e febre [33]. Alterações reprodutivas, tais como baixa fertilidade, dificuldade de ejaculação, baixa qualidade seminal, alto índice de espermatozoides morfológicamente alterados e piospermia podem ser observadas [34].

O diagnóstico muitas vezes é difícil de ser conclusivo e resulta da combinação dos sinais clínicos, espermiograma, cultura bacteriana do semen e achados ultrassonográficos [35,36]. Nos casos de orquite, o parênquima testicular geralmente mantém sua aparência ultrassonográfica homogênea, porém torna-se mais granular e hipoeecóico em relação à ecogenicidade normal [27]. Nos casos agudos de epididimite, observa-se aumento de regiões hipoeecóicas dentro do epidídimo, devido ao acúmulo de exsudato e formação de abscesso. Nos casos

crônicos, áreas do epidídimo tornam-se semelhantes em ecogenicidade ao parênquima testicular, enquanto outras demonstraram-se mais hiperecogênica, presumivelmente devido à fibrose [27,36]. Na periorquite o espessamento e acúmulo de líquido e fibrina entra as túnicas vaginais geralmente são observados na imagem ultrassonográfica [37].

O tratamento destas condições normalmente possuem prognóstico reservado, devido a grande frequência de insucessos, parte devido ao diagnóstico tardio da doença. Entretanto, nos casos agudos, o tratamento consiste em antibioticoterapia, antiinflamatório e hidroterapia, limitando o edema, inflamação e fibrose do testículo e epidídimo. Nos casos mais graves pode ser necessária castração uni ou bilateral [34,37].

Afecções do anel inguinal e cordão espermático

Hernia inguino-escrotal

As hérnias ínguino-escrotais (HIE) são caracterizadas pelo deslocamento da porção do jejuno ou íleo através do anel vaginal do canal inguinal. A HIE pode ser congênita ou adquirida [38,39]. A HIE congênita normalmente é reconhecida rapidamente após o nascimento, podendo se resolver espontaneamente durante os primeiros meses de vida. O problema também pode ocorrer em animais adultos, sendo às principais causas: trauma abdominal externo, trabalho forçado e história de HIE congênita [40]. Hérnias adquiridas em adultos são geralmente dolorosas, devido ao comprometimento intestinal, sendo, portanto casos cirúrgicos de emergências. Estudos demonstram que o diagnóstico precoce é importante no prognóstico de HIE adquiridas [41].

Os sinais clínicos da enfermidade se caracterizam por início súbito, dor aguda e intensa, rápida deterioração dos parâmetros fisiológicos, e aumento de volume em um ou ambos os lados da bolsa escrotal, com diminuição da temperatura local [38]. O diagnóstico pode ser confirmado pela palpação direta, palpação transretal e ultrassonografia da região escrotal.

A ultrassonografia pode ser de grande auxílio para diagnóstico e avaliação de viabilidade intestinal. Nos casos de HIE as alças intestinais normalmente são facilmente identificáveis, além disso, podem ser detectadas quantidades variáveis de líquido livre e aumento de ecogenicidade testicular do lado afetado [27].

O tratamento comumente utilizado na HIE é redução do intestino herniado, orquiectomia unilateral ou bilateral e o fechamento de o anel inguinal externo [40]. Adicionalmente, técnicas de hernioplastia foram desenvolvidas com o objetivo de evitar recorrência de herniação e manutenção dos testículos. Apesar de relatos de hemospermia e atrofia testicular [42,43] a hernioplastia demonstrou-se eficiente em fechar o anel inguinal e manter a produção espermática de ganhões até um ano após o procedimento cirúrgico [44].

Varicocele

Varicocele resulta da dilatação das veias do plexo pampiniforme [45], que ocorre devido a um defeito ou ausência de válvulas na veia. Em humanos a incidência desta patologia, em

varia de 8 a 20% da população adulta [46]. A fisiopatologia da varicocele não está completamente elucidada, no entanto, vários possíveis mecanismos têm sido propostos, como, por exemplo: aumento da temperatura intra-escrotal, disfunção hormonal, mudança no fluxo sanguíneo testicular venoso e estresse oxidativo [47]. Apesar de ser considerada rara em equinos esta afecção é encontrada em exames de garanhões com alterações clínicas escrotais ou portadores assintomáticos em exames andrológicos de rotina.

Seu diagnóstico pode ser feito pela palpação e ultrassonografia. Na palpação da região escrotal pode-se notar estruturas vasculares irregulares e tortuosas no cordão espermático [27]. Já no exame ultrassonográfico constata-se uma área circunscrita anecóica dentro do cordão espermático. A aparência dos vasos do cordão espermático torna-se diferente da anatomia normal, e pode estar associada à distensão da veia testicular central [48].

Clinicamente a varicocele se apresenta com edema na região escrotal causado por alteração na circulação, o que pode interferir no mecanismo de regulação da temperatura pelo plexo pampiniforme, mas seu efeito sobre a fertilidade não está completamente elucidado [39].

Em humanos, a varicocele está associada a graus de subfertilidade, sendo uma das principais causas de infertilidade masculina. Além do tratamento cirúrgico que consiste na varicolectomia [49], outros métodos terapêuticos são utilizados para evitar os efeitos deletérios ocasionados pela isquemia no parênquima testicular. Entre os medicamentos para esse fim, se destaca a pentoxifilina que proporciona resultado satisfatório em humanos [50] e em equinos no tratamento de degeneração testicular [13].

Apesar das possibilidades terapêuticas já testadas em outras espécies [41] em equinos o tratamento comumente utilizado para afecção é a orquiectomia [27] que provavelmente é realizado para evitar possíveis insultos permanentes que poderia levar a alterações no testículo colateral.

Torção do cordão espermático

Torção testicular, ou seja, torção do cordão espermático é uma condição frequentemente observada em cães e garanhões [51,52]. Torções de até 180° muitas vezes não apresentam sinais clínicos [53], no entanto, torções com mais de 270° normalmente estão associadas com cólica, podendo resultar em hematocele e hidrocele com degeneração testicular [6]. Nos casos de torção de 180° podemos notar que a cauda do epidídimo estará deslocada cranialmente. Os sintomas podem ser solucionados pela reposição do testículo na posição normal rotacionando o testículo na direção oposta [54].

Torções podem ser recorrentes e, ocasionalmente, têm sido associadas com neoplasia testicular [6,55] e criptorquidismo [55].

A forma aguda de torção do cordão espermático pode levar a distúrbios testiculares, sendo os sintomas compatíveis com quadro de orquite. Clinicamente os garanhões com torção testicular aguda apresentam cólica, edema escrotal, causado por distúrbios vasculares, e de leve a moderado aumento da temperatura [54]. O diagnóstico pode ser feito pela palpação testicular, sendo geralmente requeridos analgésicos e tranquilizantes, para facilitar o exame do cordão espermático.

A ultrassonografia pode ser utilizada para confirmação diagnóstica, que revelará distensão de vasos do cordão espermático [55] e parênquima testicular com variação da ecogenicidade, que dependerá da duração da estase venosa. Na fase aguda constata-se diminuição da ecogenicidade, que é observada antes do sangue coagular ou em casos de estase linfática. Na fase crônica o parênquima testicular torna-se hiperecótico, e está associado ao sangue coagulado e fibrose local [27]. A avaliação ultrassonográfica da veia central, artéria testicular e plexo pampiniforme permite constatar a presença ou ausência de fluxo sanguíneo [27,48]. Em humanos esse achado é mais facilmente observado com a utilização do Doppler [56,57].

Torção do cordão espermático é uma situação de emergência, que necessita de intervenção imediata. No entanto, com o diagnóstico correto e imediato ambos os testículos podem ser preservados [58] pela correção cirúrgica da torção e orquiopexia para evitar recidiva [51].

Se o testículo contralateral estiver normal, muitas vezes, não é necessária a manutenção do testículo afetado, pois pode ser obtido sêmen do testículo não afetado. Entretanto, se a torção estiver associada à inflamação e hidrocele, pode levar a um aumento da temperatura escrotal, acarretando em declínio da transitório na qualidade espermática. A partir do retorno da termorregulação o testículo contralateral deve retornar à função normal recuperando a produção espermática [55].

Usualmente, o tratamento de torção do cordão espermático com comprometimento vascular é a castração [51].

Afecções de glândulas anexas

Vesiculite seminal

A infecção bacteriana da vesícula seminal, denominada vesiculite seminal, é uma das possíveis causas de redução de fertilidade no garanhão. A despeito de ser descrita como uma enfermidade de baixa ocorrência na espécie equina, é ainda pouco diagnosticada na rotina [59,60], uma vez que apenas o exame clínico, a palpação transretal e o exame ultrassonográfico podem ser insuficientes no estabelecimento do seu diagnóstico definitivo, necessitando de um exame mais específico, o exame endoscópico [61,62].

Os agentes patogênicos mais comumente encontrados são *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* [62-66). Essas bactérias são normalmente encontradas no pênis e prepúcio, e possivelmente em decorrência de desequilíbrios na microflora desses locais, causam uma infecção ascendente que acometem as vesículas seminais de forma uni ou bilateral e ainda podem se estender às ampolas, ductos deferentes e escroto [62,64].

O garanhão acometido pela enfermidade apresenta histórico de infertilidade ou subfertilidade, distúrbio ejaculatório, disseminação de patógenos sexualmente transmissíveis e alterações físico-químicas do sêmen, causadas pela presença de polimorfonucleares, hemácias e bactérias [67]. Essas alterações promovem modificação da coloração do ejaculado, agluti-

nação, precipitação e redução da motilidade espermática e incremento de espécies reativas de oxigênio, resultando em queda da qualidade e fertilidade seminal [61,62,64].

O tratamento convencional para vesiculite seminal utiliza antibióticos por via sistêmica e é quase sempre ineficaz, devido à farmacodinâmica e farmacocinética da maioria dos medicamentos disponíveis, uma vez que eles não atingem as glândulas sexuais acessórias em concentrações adequadas [68]. Dessa forma, o tratamento local tem sido utilizado na tentativa de vencer a barreira tecidual e aumentar a concentração de antibacterianos no interior da glândula com resultados superiores ao tratamento sistêmico [65], no entanto, o índice de recidivas da infecção é bastante elevado, dado às características de persistência tecidual da maioria dos microorganismos causadores, como a formação de biofilme [66].

Obstrução de ampola

O acúmulo de espermatozoides ou fluido seminal no lúmen de uma ou ambas as glândulas ampolares, condição conhecida como obstrução de ampola, é uma das enfermidades das glândulas sexuais acessórias que reduz a fertilidade dos machos equinos e pode ter causa congênita ou adquirida [69,70].

Garanhões afetados podem apresentar hemospermia, diminuição da qualidade seminal, e em casos graves azoospermia, conduzindo a uma queda na fertilidade ou total infertilidade quando a obstrução é bilateral [69,71]. Entre as alterações seminais, destacam-se ejaculados não padronizados, hora contendo baixas concentrações espermáticas, hora contendo quantidades exorbitantes de espermatozoides. Além disso, as células espermáticas normalmente apresentam baixa motilidade e alta proporção de defeitos morfológicos, principalmente de cabeças isoladas [72,73]. Além disso quando há obstrução bilateral das ampolas ocorre um decréscimo das concentrações da enzima fosfatase alcalina no ejaculado, sugerindo a interrupção do trânsito espermático pelos condutos ejaculatórios [74].

O exame ultrassonográfico é importante no auxílio do diagnóstico definitivo desta afecção, uma vez que os garanhões afetados apresentam o lúmen ampolar aumentado, preenchido por material ecodenso (hiperecótico), provavelmente representando grande acúmulo de espermatozoides, ou anecótico quando a obstrução se deve ao acúmulo de fluido seminal [27,70].

O tratamento para garanhões com obstrução envolve massagens repetidas da ampola por palpação transretal, previamente às colheitas sucessivas de sêmen. A administração endovenosa de 20 UI de ocitocina minutos antes de cada colheita auxilia na desobstrução [73]. Quando possível, esses procedimentos devem ser realizados duas ou três vezes ao dia, e continuar até a desobstrução da glândula. A manutenção das colheitas semanais de sêmen nos animais que tendem ao acúmulo espermático deve ser mantida, para evitar novas obstruções [70,73].

Afecções de pênis

Carcinoma de células escamosas

O carcinoma de células escamosas (CEC) é a neoplasia mais frequentemente observada no pênis e prepúcio de equinos [75]. A ocorrência dessa neoplasia parece aumentar com a

idade, em animais castrados, que apresentam a pele despigmentada e higiene genital deficiente [76,77].

A fisiopatogenia do CEC ainda não foi completamente elucidada. O efeito carcinogênico do esmegma é controverso, mas a irritação crônica produzida pelo mesmo pode estimular a transformação neoplásica do tegumento peniano e prepucial [26]. A exposição excessiva à radiação ultravioleta é uma causa aceita de CEC em pele, no entanto, é uma causa menos provável em prepúcio e pênis devido a localização ventral da genitália masculina [75]. Em estudos epidemiológicos, o *Equus caballus papillomavirus 2* (EcPV-2) foi detectado em lesões localizadas em prepúcio e pênis e atualmente é a causa mais aceita do desenvolvimento de CEC peniano e prepucial na espécie equina, semelhante ao que é encontrado em humanos [78].

Os sinais clínicos de CEC prepucial ou peniano podem resultar do tumor primário ou do processo inflamatório secundário, como mau odor e descargas purulentas. As lesões geralmente se apresentam como placas despigmentadas, irregulares e erosivas que não cicatrizam — com ou sem tecido de granulação associado — e o diagnóstico definitivo é obtido por meio de biópsia [76,77].

Apesar de metastático, a disseminação das células tumorais é lenta, alcançando linfonodos regionais e posteriormente o pulmão [79]. Nas lesões iniciais, os tratamentos tópicos minimamente invasivos como a crioterapia utilizando nitrogênio líquido ou o quimioterápico 5-fluorouracil têm sido utilizados com bons resultados. Quando as lesões são mais extensas, mas os linfonodos regionais não foram atingidos, a retirada cirúrgica do tumor com boa margem de segurança na maioria das vezes resulta em bom prognóstico [80].

No entanto, quando há envolvimento de linfonodos regionais o prognóstico torna-se desfavorável e a chance de recidivas ocorrer é elevada. A amputação do pênis em casos mais graves pode ser recomendada, mas o gananhão pode ser mantido em reprodução por meio de técnicas de ejaculação química ou mediante colheita e preservação de sêmen do epidídimo [6,76,81].

Distúrbios ejaculatórios

Os distúrbios ejaculatórios em animais são definidos como uma dificuldade no processo ejaculatório, mesmo quando os demais comportamentos sexuais são normais [82]. Estes distúrbios são variados e podem estar associados a um antagonismo entre os sistemas parassimpáticos e simpáticos, falhas da contração da musculatura lisa no trato genital [83] ou ainda podem estar relacionados a fatores psicológicos, tais como: mudanças na rotina do gananhão ou na coleta de sêmen, esgotamento no final da estação de monta; e fatores físicos, sendo eles, dores lombo-sacra e articulações do membro pélvico, sequelas de EPM (Encefalomielite por protozoário) e distúrbios circulatórios relacionados a idade avançada.

A ejaculação química há alguns anos vem sendo utilizada como método alternativo para aumentar a função ejaculatória na cobertura, bem como indução ejaculatória sem monta. Este método incluem combinações de agentes e procedimentos de pré-tratamento, apresentando taxas de ejaculação que variam entre 30 e 75% das tentativas [84].

As alterações mais comuns correspondem à falha de ejaculação e contaminação de sêmen com urina correspondendo a 59% e 36 % dos déficits ejaculatórios, respectivamente. Outros distúrbios ejaculatórios menos comuns são: emissão sem ejaculação; azoospermia emissão ou ejaculação prematura [82].

Incompetência do colo da bexiga

A emissão e o fechamento do colo vesical é controlado pelo sistema nervoso simpático α adrenérgico, além das causas locais como fibrose [85], tumores, alterações neurogênicas podem estar envolvidos na patogênese desta afecção [86].

O comprometimento funcional do colo da bexiga em garanhões leva a contaminação de sêmen com urina [82]. Este processo denominado urospermia, pode levar a uma condição intermitente ou persistente de subfertilidade [87]. O efeito deletério da urina sobre os espermatozoides são secundários às alterações no pH e osmolaridade. Sendo constatados queda significativa da motilidade espermática quando mais de 5% do volume de urina a foi adicionada experimentalmente na amostra seminal [88].

Alguns fármacos têm sido utilizado em garanhões com urospermia para aumentar o tônus do esfíncter da bexiga [82,87]. O tratamento com cloridrato de imipramina associado a micção antes da colheita de sêmen tem melhorado o grau de recuperação espermática pela redução da quantidade de urina nas amostras seminais [89]. Outra alternativa para minimizar o prejuízo na qualidade seminal, decorrente da contaminação com urina, é adicionar diluente no copo coletor para que no momento da ejaculação.

Azoospermia

Esta condição normalmente pode ser secundária a uma degeneração testicular e aplasias bilaterais dos ductos deferentes [82] ou epidídimo e obstrução bilateral de ampolas [69].

Na maioria dos casos de suspeita de azoospermia, foi constatado que o fluido avaliado eram secreção pré ejaculatórias [82] relacionada com distúrbios ejaculatórios. Em casos de azoospermia, a biópsia testicular e ultrassonografia são importantes para o diagnóstico de degeneração testicular e obstrução de ampola por cistos pélvicos, respectivamente [69].

Déficits de monta

Disfunções ejaculatórias muitas vezes estão acompanhadas de deficiências musculoesqueléticas demonstrando desconforto durante a monta que sugerem dor, fraqueza ou alterações neurológicas [82]. Em função da utilização de garanhões reprodutores com idade avançada, aumenta ainda mais a prevalência destas alterações musculoesqueléticas ocasionadas pela senilidade e por lesões ocasionadas pela performance esportiva durante a vida do animal.

Garanhões com distúrbios neurológicos comumente apresentam dificuldade de inserção do pênis pela instabilidade durante a monta. Se for resultado de dor ou fraqueza costuma

intensificar com as repetidas tentativas de monta. As principais causas associadas a estas condições incluem doença degenerativa do jarrete, lombalgias, pleurite, lesão nos membros torácicos adquiridas durante a cópula, lesões no pênis, epididimite, torção do cordão espermático e trombose da aorta ilíaca [82].

Indução farmacológica da ejaculação

Nos casos de distúrbios ejaculatórios, a ejaculação química vem sendo utilizada como método alternativo para aumentar a função ejaculatória na cobertura e na indução ejaculatória sem monta [84].

Os principais fármacos utilizados incluem: 1) α adrenérgicos, como a Cloridato de Xilaziana [84,90] e Detomidina [91]; 2) prostaglandina, estimulam a contração da musculatura lisa genital do garanhão [92] e 3) a imipramina [84,92], antidepressivo tricíclico, age na inibição da recaptação neuronal de noradrenalina [93], assim o neurotransmissor permanece por um período maior para reação com os receptores.

Os estudos desenvolvidos mostram variedade de doses, protocolos, vias de administração, combinações de agentes e procedimentos pré-tratamento, apresentando taxas de ejaculação entre 27-75% das tentativas [84,90,94,95].

Após a indução, o ejaculado pode ser recuperado com um saco plástico que recobre o perímetro prepucial ou com auxílio de um Becker. Os ejaculados induzidos com PGF₂ α apresentam maior volume, menor concentração espermática com semelhante número de espermatozoides pelo aumento da contração de glândulas acessórias resultando em maior volume de plasma seminal [84]. A utilização de imipramina ou detomidina, por aumentar a contração da ampola e inibir as glândulas anexas, tem-se, então, ejaculados com menor volume e maior concentração espermática [94,96].

O intervalo entre administração e ejaculação apresenta grande variação dependendo do protocolo. Apenas xilazina ou associada a imipramina as ejaculações comumente ocorrem de 1 a 3 minutos ou 15 a 25 minutos depois da administração [90,92,94,95]. Induzidas com imipramida ou prostaglandina geralmente ocorrem de 10 a 50 minutos após a administração [92].

Os efeitos colaterais diferem dependendo do protocolo empregado. A utilização de Prostaglandina F₂ α pode provocar sudorese e gotejamento de urina, dificultando a obtenção de sêmen livre de urina e suor [84]. A xilazina pode provocar sedação profunda, bem como a imipramina intravenosa leva a hemólise, relatada por McDonnell e Odian [94]. Além disso, a administração de 2.2 mg/Kg de imipramina foi associada a movimentos de mastigação e sialorréia.

Considerações Finais

O conhecimento da fisiopatogenia, métodos diagnósticos e terapêuticos das principais desordens reprodutivas dos machos equinos possibilita uma intervenção precoce, favorecendo o prognóstico do animal e reduzindo o impacto econômico gerado por estas enfermidades na indústria equina.

Referências Bibliográficas

- [1] Watson ED, Clarke CJ, Else RW, Dixon PM. Testicular degeneration in 3 stallions. **Equine Veterinary Journal** 1994; 26: 507-10.
- [2] Amann RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology** 1981; 2: 37-58.
- [3] Setchell BP. The parkes lecture heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility** 1998;114(2):179-94.
- [4] Turner RM. Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice** 2007 (a); 6: 278-84.
- [5] Blanchard TL, Varner DD. Testicular Degeneration. In **Equine Reproduction**. McKinnon AO, Voss JL. Philadelphia: Lea & Febiger 1993; 855-60.
- [6] Edwards FJ. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. **Animal Reproduction Science** 2008; 107: 197-207.
- [7] Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology** 1997; 48: 1199-1216.
- [8] Blanchard TL, Bretzlaff, K, Varner DD. Identifying testicular hypoplasia in large animals. **Veterinary Medicine** 1990; 85: 405-08.
- [9] DelVento VR, Amann RP, Trotter GW, Veeramachaneni DNR, Squires EL. Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. **American Journal of Veterinary Research** 1992; 53: 2094-101.
- [10] Blanchard TL, Johnson L, Varner DD, Rigby S, Brinsko S, Love CC. Low daily sperm output per ml of testis as a diagnostic criteria for testicular degeneration in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science** 2001; 21:11-35.
- [11] Blanchard TL, Johnson L. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell:Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. **Theriogenology** 1997; 47: 665-77.
- [12] Lagerlof N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine** 1938; 33: 550-61.
- [13] Sancler-Silva YFR. **Efeito da pentoxifilina na função testicular e produção espermática de equinos submetidos a estresse térmico escrotal**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, São Paulo 2017; 141 p.
- [14] Lu KG. Clinical Diagnosis of the Cryptorchid Stallion. **Clinical Techniques in Equine Practice** 2005;4:.250-56.
- [15] Basrur PK. Disrupted sex differentiation and feminization of man and domestic animals. **Environmental Research** 2006;100:18–38.
- [16] Hafez ESE & Hafez B. **Reprodução animal**, 7.ed. São Paulo: Manole, 2004.
- [17] Klonisch T, Stege K, Kehlen A, Allen WR, Froehlich C, Kauffold J, Bergmann M, Hombach-Klonisch S. INSL3 Ligand receptor in the equine testis. **Biology Reproduction** 2003; 68: 1975–81.
- [18] Hayes HM. Epidemiological features of 5009 cases of equine cryptorchidism. **Equine Veterinary Journal**. 1986; 18:467–471.
- [19] Ghosh S, Das PJ, Arnold C, Jaxheimer J, Varner DD, Chowdhary BP, Raudsepp T. Contribution of DNA copy number variants to equine cryptorchidism. **Journal equine veterinary science** 2014;34: 29.
- [20] Arighi M, Bosu W. 1989. Comparison of hormonal methods for diagnosis of cryptorchidism in horses. **Journal equine veterinary science** 1989; 9: 20–26.
- [21] Vilar JM, Batista M., Carrillo JM, Rubio M, Sopena J, Álamo D. Histological, cytogenetic and endocrine evaluation in twenty-five unilateral cryptorchid horses. **Journal of applied animal research** 2018; 46:1: 441–444

- [22] McEntee K. Scrotum, spermatic cord, and testis: proliferative lesions. In: **Reproductive Pathology of Domestic Animals**. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990; 279–306.
- [23] Murase H, Saito S, Amaya T, Sato F, Ball BA, Nambo Y. Anti-müllerian hormone as an indicator of hemicastrated unilateral cryptorchid horses. **Journal equine veterinary science** 2015; 26: 15–20.
- [24] Hartman R, Hawkins JF, Adams SB, Moore G E, Fessler JF. Cryptorchidectomy in equids: 604 cases (1977–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Vol 246, No. 7, April 1, 2015.
- [25] Bu Q, Pan Z, Jiang S, Wang A, Cheng H. The Effectiveness of hCG and LHRH in Boys with Cryptorchidism: A Meta-Analysis of Randomized. **Controlled Hormone and Metabolic Research** 2016; 48: 318–324
- [26] Brinsko SP. Neoplasia of the male reproductive tract. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. 1998;14:517–533.
- [27] Turner RM. Ultrasonography of the genital tract of the stallion. In: REEF, V.B. **Equine Diagnostic Ultrasound** 1998; 446-479.
- [28] Raman DJ, Craig FN, Marc G. Increased incidence of testicular cancer in men presenting with infertility and abnormal semen analysis. **The Journal of Urology**, 2005; 182: 1819-22.
- [29] Hendry WF, Stedronska J, Jones CR. et al. Semen analysis in testicular cancer and Hodgkin's disease: pre- and post-treatment findings and implications for cryopreservation. **British Journal of Urology** 1983; 55(6): 769–773
- [30] Santos RL, Alessi AC. **Patologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2014. 892 p.
- [31] Zhang J, Ricketts SJ, Tanner SJ. Antisperm antibodies in the semen of a stallion following testicular trauma. **Equine Veterinary Journal** 1990; 22: 138–141.
- [32] Papa FO, Alvarenga MA, Lopes MD, Campos Filho EP. Infertility of autoimmune origin in a stallion. **Equine Veterinary Journal** 1990; 22:145-46.
- [33] Held JP, Adair S, McGavin MD, Adams WH, Toal R, Henton J. Bacterial epididymitis in two stallions. **Journal of American Veterinary Medicine Association** 1990; 197:602-4.
- [34] Burns RMO. The Epididymis. In **Current Therapy in Equine Reproduction**, Second Ed. Elsevier 2007; 171-3.
- [35] De Vries PJ. **Diseases of the testes, penis, and related structures**. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger 1993; 881-82.
- [36] Wilson KE, Dascanio JJ, Duncan R, Delling U, Ladd SM. Orchitis, epididymitis and pampiniform phlebitis in a stallion. **Equine Veterinary Education** 2007;19(5): 239-43.
- [37] Tibary A, Pearson LK, Fite CL. Reproductive Tract Infections. In **Equine Infectious Diseases** (Second Edition), Elsevier 2014; 84-106.
- [38] Rio Tinto JJM, Alves GES, Santos RL, Faleiros RR, Marques Junior AP, Melo EG. Fechamento parcial do anel inguinal externo em eqüinos: avaliação pós-operatória e influência na morfologia testicular. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 2004; 56 (6):715 –22.
- [39] Morresey PR. The Enlarged Scrotum. **Clinical Techniques in Equine Practice** 2007;6: 265-270.
- [40] Van Der Velden MA. Ruptured inguinal hernia in new-born colt foals: A review of 14 cases. **Equine Veterinary Journal** 1988; 20(3):178-81.
- [41] Schneider RK, Milne DW, Kohn, CW. Acquired inguinal hernia in the horse: a review of 27 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 1982;180:317-20.
- [42] Wilderjans H, Meulyzer M, Simon O. Standing laparoscopic peritoneal flap hernioplasty technique for preventing recurrence of acquired strangulating inguinal herniation in stallions. **Veterinary Surgery Journal** 2012; 41: 292–9.
- [43] Rossignol F, Perrin R, Boening KJ. Laparoscopic hernioplasty in recumbent horses using transposition of a peritoneal flap. **Veterinary Surgery Journal** 2007;36:557–62.

- [44] Gracia-Calvo LA, Duque J, Balao da Silva C, Ezquerra J, Ortega-Ferrusola C. Testicular perfusion after standing laparoscopic peritoneal flap hernioplasty in stallions. **Theriogenology** 2015; 84: 797–4.
- [45] Jarow JP. Effect of varicocele on male fertility. **Human Reproduction Update** 2001;7:59-64.
- [46] Love CC, Varner DD. Ultrasonography of the scrotal contents and penis of the stallion. In McKinnon AO, Rantanen NW. **Equine diagnostic ultrasonography**, Williams & Wilkins, Philadelphia 1998;253-269.
- [47] Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility. Part II. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. **Hum Reprod.** 2001;7:473-81.
- [48] Love CC. Ultrasonographic evaluation of the testis, epididymis, and spermatic cord of the stallion. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 1992;1 (8):167-82.
- [49] Zaazaa A, Adel A, Fahmy I, Elkhiat Y, Awaad AA, Mostafa T. Effect of varicocelectomy and/or mast cells stabilizer on sperm DNA fragmentation in infertile patients with varicocele. **Andrology** 2018; 6(1): 146-50.
- [50] Oliva A, Dotta A, Multigner L. Pentoxifylline and antioxidants improve sperm quality in male patients with varicocele. **Fertility and Sterility** 2009; 91 (4): 15536-39
- [51] Threlfall WR, Carleton CL, Robertson J, Rosol T, Gabel A. Recurrent torsion of the spermatic cord and scrotal testis in a stallion. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1990;196:1641-43.
- [52] Parker NA, Howard RD, May KA. Severe scrotal pain associated with herniation of the testis and epididymis in an Arabian stallion. **Equine Veterinary Education.** 2001;13:172–4.
- [53] Turner RMO. Testicular abnormalities. In: Samper JC, Jonathan Pycock J, McKinnon AO. **Current Therapy in Equine Reproduction**, Philadelphia: W.B. Saunders., 2006; 30:195-204.
- [54] Kenney RM. Clinical fertility evaluation of the stallion. **American Association of Equine Practitioners** 1975; 21: 336-337.
- [55] Hunt RJ, Hay W, Collatos C, Welles E. Testicular seminoma associated with torsion of the spermatic cord in two cryptorchid stallions. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1990; 197: 1484–86.
- [56] Oguzkurt P, Okur DH, Tanyel FC, Bykpmukçu N, Hiçsönmez A. The effects of vasodilation and chemical sympathectomy on spermatogenesis after unilateral testicular torsion: a flow cytometric DNA analysis. **British Journal of Urology** 1998;82:104-8.
- [57] Chan JL, Knoll JM, Depowski PL, Williams RA, Schober JM. Mesorchial Testicular Torsion: Case Report and a Review of the Literature. **Urology** 2009;73(1):83-6.
- [58] Blaivas M, Sierzynski P, Lambert M. Emergency evaluation of patients presenting with acute scrotum using bedside ultrasonography. **Academic Emergency Medicine** 2001;8:90-9.
- [59] Blanchard TL, Varner DD, Hurtgen JP, Love CC, Cummings MR, Strezmienski PJ, Benson C, Kenney RM. Bilateral seminal vesiculitis and ampullitis in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association** 1988; 15(192(4): 525-26.
- [60] Freestone JF, Paccamonti DL, Eilts BE, McClure JJ, Swiderski CE, Causey RC. Seminal vesiculitis as a cause of signs of colic in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association** 1993; 15(203): 556-57.
- [61] Miragaya MH, Pinto MR, Neild DM. Muestreo y lavage de glándulas vesiculares en el padrillo. In: **II Congreso n Equine Reproduction** 2011;71-72.
- [62] Sancler-Silva YFR, Monteiro GA, Ramires-Neto C, Alvarenga MA, Papa FO . Como diagnosticar e tratar vesiculite seminal em garanhões? **Revista Brasileira de Medicina Equina** 2013; 46:168-72.
- [63] Tibary A, Rodriguez JS. Causas e Manejo de lãs subfertilidad em padrillos. In: **II Congresso on Equine Reproduction** 2011;55-69.
- [64] Varner DD, Taylor TS, Blanchard TL. Seminal Vesiculitis. In: **Equine Reproduction. Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD.** 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011.

- [65] Pinto MR, Neild DM, Benegas D, Vieyra DH, Miragaya MH. Successful Treatment of Seminal Vesiculitis with Imipenem-Cilastatin in a Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science** 2014;1-5.
- [66] Sancler-Silva YFR. **Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre qualidade e longevidade do sêmen equino**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – UNESP, Botucatu, São Paulo, 136 p. 2014.
- [67] Tibary A, Rodriguez J, Samper JC. Microbiology and Diseases of Semen. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Samper, J.C. 2nd Ed., Saunders, Philadelphia, PA, 2009.
- [68] Chenier TS. Anatomy and physical examination of the stallion. In SAMPER, C.S. **Equine breedings management and artificial insemination** 2009; 2 Ed:1-17.
- [69] Pozor MA, Macpherson ML, Troedsson MH, Klein C, Diaw M, Buergelt C, Dillon L. Midline cysts of colliculus seminalis causing ejaculatory problems in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science** 2011;31:722-31.
- [70] McCue PM, Scoggin CF, Moffett PD, Burden CA, Ferris RA. Spermiostasis in stallions: a retrospective study of clinical cases. **Journal of Equine Veterinary Science** 2014; 34(1): 47.
- [71] Blanchard TL, Brinsko SP, Varner DD, Love CC. How to investigate azoospermia in stallions. **AAEP Proceedings – Non pregnant mare and stallion** 2009; 55: 331-335.
- [72] Klewitz J, Probst J, Baackmann C, Keppler S, Ortgies F, Heberling A. Obstruktion der Samen leiter ampullen (plugged ampullae) als Ursache einer Azoospermie bei einem Hengst. **Pferdeheilkunde** 2012; 28: 14-7.
- [73] Segabinazzi LG, Silva LF, Okada C, Medrado F, Papa F, Alvarenga MA. Plugged Ampullae in a Donkey Stallion (*Equus asinus*). **Journal of Equine Veterinary Science** 2018; 63: 24-26.
- [74] Turner RMO, McDonnell SM. Alkaline Phosphatase in Stallion Semen: Chacterization and Clinical Applications. **Theriogenology** 2004; 60: 1-10.
- [75] Van den Top JGB, Heer ND, Klein WR, Ensink JM. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse: a retrospective study of treatment of 77 affected horses. **Equine Veterinary Journal** 2008; 40(6):533-37.
- [76] Mair TS, Walmsley JP, Phillips TJ. Surgical treatment of 45 horses affected by squamous cell carcinoma of the penis and prepuce. **Equine Veterinary Journal** 2000; 32(5):406-10.
- [77] Van den Top JGB, Ensink JM, Barneveld A, Van Weeren PR. Penile and preputial squamous cell carcinoma in the horse and proposal of a classification system. **Equine Veterinary Education** 2011;23(12):636-648.
- [78] Knight CG, Munday JS, Peters J, Dunowska M. Equine penile squamous cell carcinomas are associated with the presence of equine papillomavirus type 2 DNA sequences. **Veterinary Pathology** 2011;48(6):1190-94.
- [79] Howarth S, Lucke VM, Pearson J. Squamous cell carcinoma of the equine external genitalia: a review and assessment of penile amputation and urethrostomy as a surgical treatment. **Equine Veterinary Journal** 1991; 23:53-58.
- [80] Fortier LA and Mac Harg, MA. Topical use of 5-fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma of the external genitalia of horses: 11 cases (1988-1992). **Journal of American Veterinary Medical Association** 1994; 205:1183-1183.
- [81] Markel MD, Wheat JD, Jones K. Genital neoplasms treated by en bloc resection and penile retroversion in horses: 10 cases (1977–1986). **Journal of American Veterinary Medical Association** 1988;192: 396-400.
- [82] McDonnell SM. Ejaculation: physiology and dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice** 1992;8 (1): 57-70.
- [83] Rasbech NO. Ejaculatory disorders of the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl 1975; 23:123-8.
- [84] McDonnell S.M. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically induced ex copula ejaculation in stallions. **Animal Reproduction Science** 2001; 68:153-59.
- [85] Varner DD, Bowen JÁ, Johnson L. Capacitation and acrosome reaction of equine spermatozoa by heparin. **Molecular Andrology** 1992;4:81–100.

- [86] McKinnon AO, Voss JL. Equine reproduction. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993;828–29. Mycek MJ, Gertner SB, Perper MM. Antidepressant Drugs. In: **Pharmacology**. 2. ed. Philadelphia: 1992;119-26.
- [87] Hoyos Sepúlveda M.L, Queiroz Rocha GF, Brumbaugh GW, Montiel QJ, Rodríguez MS, Morales EC. Lack of Beneficial Effects of Bethanechol, Imipramine or Furosemide on Seminal Plasma of Three Stallions with Urospermia. **Reproduction Domestic Animal** 1999; 34: 489-93.
- [88] Griggers S, Paccamonti DL, Thompson RA, Eilts BE. the effects of ph, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology** 2001; 56: 613-22.
- [89] Oristaglio Turner RM, Love CC, McDonnell SM, Sweeney RW, Twitchell ED, Habecker PL, Reilly LK, Pozor MA, Kenney RM. Use of imipramine hydrochloride for treatment of urospermia in a stallion with a dysfunctional bladder. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 1995;207(12):1602-06.
- [90] JOHNSTON, P.F.; DeLUCA, J.L. Chemical ejaculation of stallions after administration of oral imipramine followed by intravenous xylazine. **Proc. AAEP**, v.43, p.59–62, 1998.
- [90] Johnston PF, DeLuca JL. Chemical ejaculation of stallions after administration of oral imipramine followed by intravenous xylazine. **American Association of Equine Practitioners** 1998;43:59–62.
- [91] Rowley DD, Lock TF, Shipley CF. Fertility of Detomidine HCl–Induced Ex Copula – Ejaculated Stallion Semen After Storage at 5°C. **American Association of Equine Practitioners** 1999;45:221-23.
- [92] McDonnell SM, Love CC. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. **Theriogenology** 1991;36:73–76.
- [93] Breier A, Ginsberg EM, Charney DS. Seminal emission induced by tricyclic antidepressant. **American Journal of Psychiatry** 1984;141(4):610-11.
- [94] McDonnell SM, Odian MJ. Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. **Theriogenology** 1994; 41:1005–10.
- [95] Card CE, Manning ST, Bowman P, Leibel T. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. **The Canadian Veterinary Journal** 1997;38: 171-74.
- [96] Dutra FO. **Indução da ejaculação em equinos através da utilização da imipramina e de sua associação com a xilazina**. 2000. 39f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Fertilidade de touros em programa de IATF

Fabio Girardi Frigoni

CRV Lagoa, fabio.frigoni@crvlagoa.com.br

Abstract: In order to predict the potential fertility of bulls, several laboratory tests have been used to evaluate the post-cryopreservation quality of the semen doses used in the timed-AI. However, the results of these tests do not always correlate with the results of field fertility. Besides that, until the current moment, no laboratory test has been able to predict, with adequate repeatability, the real fertility of a sire. In view of this reality and the need to promote greater accuracy in the results of the timed-AI, CRV Lagoa has created the IFert™, a program with the aim of detect which bulls guarantee the best fertility rates within timed-AI programs.

Keywords: insemination; pregnancy; semen.

Palavras-chave: inseminação; prenhez; sêmen.

Introdução

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) é uma das biotécnicas mais utilizadas para aumentar o desempenho reprodutivo das fazendas que exploram a atividade de cria. Tal relevância é comprovada pelo crescente aumento no mercado de fármacos comercializados para promoverem a sincronização dos lotes reprodutivos, bem como pelo aumento do número de doses de sêmen comercializadas no país nos últimos anos. De acordo com Baruselli et al. (2012) mais da metade das doses de sêmen comercializadas em 2011 no Brasil foram utilizadas em fêmeas que tiveram a onda folicular sincronizada. Em 2017, essa proporção chegou a 85% (Baruselli, dados não publicados), corroborando a aceitabilidade da técnica pelo mercado.

Por outro lado, muitos fatores estão relacionados ao sucesso ou insucesso nos resultados de prenhez dos programas de IATF, o que determinam tanto a viabilidade da técnica quanto a sua permanência nas fazendas que a utilizam. Segundo Nasser et al. (2011), apesar da satisfatória sincronização da onda folicular e do momento preciso da ovulação, existem vários fatores que podem afetar a eficiência dos programas de IATF. O conhecimento do impacto desses fatores sobre os programas comerciais de IATF no Brasil tem fundamental importância para aumentar a eficiência produtiva e reprodutiva do rebanho nacional. Ainda de acordo com Nasser et al. (2011), ao analisar dados de mais de 32 mil IATFs realizadas em fêmeas de corte, verificaram que a taxa de prenhez pode ser influenciada, dentre outros fatores, pelo escore de condição corporal (ECC) que as fêmeas apresentavam no início do protocolo de sincronização, pela propriedade rural, pelo touro utilizado e pelo desempenho pessoal durante os procedimentos de inseminação.

Cutaia e Bó (2004) concluíram que vários são os fatores que estão correlacionados com os resultados da IATF em rebanhos de corte, entre eles: ECC, categorias de parto (núlparas, primíparas e múltiparas), ciclicidade ovariana e o grupo genético do rebanho (*Bos taurus* vs *Bos indicus*).

Da mesma forma, Sá Filho et al. (2009) relataram que a taxa de prenhez em programas de IATF pode ser influenciada por diversas variáveis, tais como a raça (*Bos taurus*, *Bos indicus* e animais mestiços), a categoria de parto da fêmea, o ECC mensurado no dia da inseminação por tempo fixo, o inseminador e o sêmen (touro doador utilizado). Em suma, antes da implementação dos programas reprodutivos em propriedades de corte, uma criteriosa avaliação desses fatores deve ser realizada visando a aplicabilidade e eficiência desta biotecnologia, o que reflete diretamente no retorno econômico da atividade de cria.

Com o intuito de prever o potencial de fertilidade de touros, vários são os testes laboratoriais utilizados para avaliar as características seminais pós-criopreservação das doses de sêmen utilizadas na IATF. Dentre as características espermáticas mais analisadas destacam-se a motilidade progressiva (KJAESTAD et al., 1993; FARREL et al., 1998; VERSTEGEN et al., 2002), morfologia (BARTH, 1992; SAACKKE, 1998) e a integridade de membranas (CORREA et al., 1997; BRITO et al., 2003; JANUSKAUSKAS et al., 2003; TARTAGLIONE & RITTA, 2004). Entretanto, embora essas características sejam importantes na análise da qualidade seminal *in vitro*, os resultados desses testes nem sempre se correlacionam com a fertilidade *in vivo* do sêmen (OLIVEIRA, 2012). Todavia, variações substanciais são comumente observadas entre os experimentos e baixas correlações são usualmente detectadas quando essas características espermáticas são comparadas isoladamente com a fertilidade a campo (ZHANG et al., 1999; SUDANO et al., 2011). Assim sendo, até o atual momento, nenhum teste laboratorial foi capaz de prever, com devida repetibilidade, a real fertilidade de um reprodutor (ARRUDA et al., 2007; SUDANO et al., 2011). Deste modo, ainda hoje, o método mais eficaz e acurado de se estimar a fertilidade de um touro é por meio de testes de fertilidade a campo (ZHANG et al., 1999), que além de trabalhosos e demorados, são muito onerosos (LARSSON & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Diante dessa realidade e necessidade de promover maior segurança nos resultados da IATF, a CRV Lagoa criou o IFert™, programa que visa detectar quais são os reprodutores que garantem os melhores índices de fertilidade dentro dos programas de IATF, comparando-os de forma justa dentro de lotes de IATF contemporâneos.

Material e Métodos

O IFert™ é um índice determinado através de avaliação estatística, disponibilizado pela CRV Lagoa, capaz de prever o potencial de fertilidade de reprodutores de corte dentro da IATF. Dentro de uma base de dados com mais de 200.000 IATFs, contemplando mais de 550 reprodutores, é realizado um filtro onde fatores ligados aos “lotes” são isolados, a fim de avaliar apenas o “fator touro” dentro do resultado da IATF. Todos os reprodutores pertencentes à base de dados são comparados entre si (conectabilidade), com critérios estatísticos robustos, capazes de ajustar o potencial de fertilidade de todos os reprodutores dentro de uma única base de dados (contemporaneidade).

Números observados dentro do estudo a campo

Dentro desse estudo com dados robustos e confiáveis sobre fertilidade de touros na IATF, encontram-se animais com baixa, média e alta fertilidade com parâmetros de avaliações espermáticas laboratoriais muito próximas considerando concentração, motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais. Existe touro com índice de prenhez de 26,8 pontos percentuais acima da média, enquanto outro touro com índice de 25,6 pontos percentuais abaixo da média, ou seja, quando utilizados num mesmo lote de IATF, sob as mesmas condições nutricionais, inseminadores, protocolos, etc, onde os desafios reprodutivos sejam iguais, a diferença de concepção das fêmeas inseminadas pode chegar a 52,4 pontos percentuais.

Considerações Finais

Diante da realidade observada e das variações existentes na fertilidade de touros utilizados em programas de IATF, é imprescindível a escolha de sêmen que garanta bons índices reprodutivos previamente validados em avaliações de campo confiáveis, assim conseguimos aumentar os resultados de prenhez dentro dos lotes da IATF. Além disso, existe a necessidade de se criar um teste laboratorial que simule as condições encontradas pelo espermatozoide no trato reprodutivo feminino após a inseminação, que tenha alta acurácia e repetibilidade.

Referências Bibliográficas

- ARRUDA, R.P.; DE 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. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.
- BARTH, A.D. The relationship between sperm abnormalities and fertility. In: **Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, pp. 47-63, 1992.
- BARUSELLI, P.S., SALES, J.N.S., SALA, R.V., VIEIRA, L.M., SÁ FILHO, M.F. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Anim Reprod**, v.9, n.3, p.139-152, Jul./Sept. 2012.
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESELS, 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**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen thawed sperm characteristics assessed via the routine sêmen analysis, sperm functional tests and the fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997.
- SUDANO, M.J.; CRESPILO, A.M.; FERNANDES, C.B.; MARTINS JUNIOR, A.; PAPA, F.O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in Zebu bulls. **Vet. Med. Intern.**, ArticleID: 436381, p.1-6, 2011.
- CUTAIA, L., BÓ, G.A. Avaliação de diferentes fatores que afetam a porcentagem de prenhez em vacas inseminadas em tempo fixo. In: 1º Simpósio Internacional de Reproducción Bovina, **Anais...**Barquisimeto, 2004.
- FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-879, 1998.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull sêmen in relation with sperm viability, chromatin structure and field fertility. **Theriogenology**, v.60, p.743-758, 2003.

KJAESTAD, H.; ROPSTAD, E.; BERG, K.A. Evaluation of spermatological parameters used to predict the fertility of frozen bull sêmen. **Acta Vet. Scand.**, v.34, n.3, p.299–303, 1993.

LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use in vitro fertilization tests to predict sêmen fertility? **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.327–336, 2000.

NASSER, L.F., PENTEADO, F., REZENDE, C.R., SÁ FILHO, M.F., BARUSELLI, P.S. Fixed time artificial insemination and embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39 (Suppl 1), p. s15-s22, 2011.

OLIVEIRA, L.Z. **Utilização de diferentes touros na iatf: características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo.** 2012. 193f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.

SÁ FILHO, O.G., MENEGHETTI, M., PERES, R.F.G., LAMB, C.G., VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210-218, 2009

SAACKE, R.G.; DEJARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? **Theriogenology**, v.51, p.117–128, 1998.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull sêmen. **Theriogenology**, v.62, n.7, p.1245–1252, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

ZHANG, B.R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.G.H.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed sêmen from young dairy bulls entering an AI-programme. **Internat. J. Androl.**, v.22, p.253–260, 1999.

Agradecimentos: CRV Lagoa, veterinários, inseminadores e fazendas que colaboram com o banco de dados do IFert™.

Sêmen bovino refrigerado: por que e quando utilizar?

Juliana Corrêa Borges Silva

Embrapa Pantanal – juliana.correa@embrapa.br

Abstract: The use of the cooled semen in cattle will still have to break many paradigms, like any biotech that comes as a novelty. Although, it is an old practice, it is not routine in the bovine species and is seen with great expansion potential, precisely because of the FTAI protocols. That is, it is possible to program to collect a specific bull and inseminate the females with a significant increase in pregnancy, when compared to the same bull if to be used with the frozen semen. It will not be a biotechnology available to everyone, just as no technology is. For example, FTAI, ET, IVF, Cloning whereas for one property can be excellent, it may not be for the other, because to costs, labor, logistics, equipment, etc. There are numerous factors that make unfeasible the use a the same biotechnology. However, the few papers available in the literature show good results for the adoption of this biotechnology. It is known, as mentioned above, that it is a new line of research, precisely because it was abandoned after the glycerol discovery in the 1940s. Thus, many experiments can contribute to the improvement of the cooled semen, increasing longevity and facilitating adoption, in like to logistics, for example. The most important of the producer and / or technician responsible to understand is that if he to reproduce the better bulls, investing in the purchase of these animals, the better the added value to the calf produced. In this way, increasing the birth rate, together with the quality of these born animals, is what we recommend in adopting this practice.

Keywords: bull; pregnancy rate; semen quality.

Palavras-chave: touro; taxa de prenhez; qualidade seminal.

Introdução

O uso de sêmen refrigerado em bovinos ainda terá que quebrar muitos paradigmas como qualquer biotécnica que chega com novidade. Apesar de ser uma prática antiga, não é nada rotineira na espécie bovina e é vista com grande potencial de expansão, justamente, por causa dos protocolos de IATF. Ou seja, é possível se programar para coletar o determinado touro e inseminar as fêmeas protocoladas com aumento significativo de prenhez, quando comparado ao mesmo touro se fosse utilizado com o sêmen congelado [1,2,3,4,5]. Não será uma biotécnica disponibilizada para todos, do mesmo modo que nenhuma tecnologia é. Por exemplo, IATF, TE, FIV, Clonagem ao passo que para uma propriedade pode ser excelente, pode não ser para a outra, ou em relação aos custos, mão-de- obra, logística, equipamentos, etc, existem inúmeros fatores que inviabilizam o uso de qualquer biotécnica. No entanto, os poucos trabalhos disponíveis na literatura, demonstram bons resultados para a adoção dessa biotécnica [1,3,4,5,6]. Sabe-se, como mencionado acima, que é uma linha de pesquisa nova, justamente por ter sido abandonada após a descoberta do glicerol, na década de 40. Além

disso, a situação fisiológica era muito diferente, já que as inseminações eram com observação de cio natural. Assim, muitos experimentos podem contribuir para a melhora do sêmen refrigerado, aumentando sua longevidade e facilitando sua adoção em relação a logística, por exemplo. O mais importante do produtor e/ou responsável técnico ter em mente, é que se ele reproduzir touros melhoradores, investindo então na compra desses animais, melhor será a agregação de valor ao bezerro produzido. Desse modo, aumentar a taxa de natalidade, juntamente com a qualidade desses animais nascidos, é o que recomendamos na adoção dessa prática.

Por que utilizar agora?

Embora exista inúmeras vantagens e aplicações, a criopreservação induz danos às células, isto é fato. E por isso veio a hipótese: e se não congelarmos essa célula e só refrigerarmos, será que melhora a prenhez na IATF? Antes, não seria possível, em termos de praticidade, inseminar artificialmente com uso de sêmen refrigerado, após observação de cio. No entanto, a utilização de IATF tomou um espaço considerável na pecuária de corte, principalemnte por causa do retorno à ciclicidade de vacas paridas. Então, por casua exclusivamente da IATF, agora, é possível se cogitar a utilização de sêmen refrigerado. Mas a questão era, será que melhora? Fisiologicamente, o dano na célula ocorre, principalmente na membrana e é causada por alterações de temperatura que a célula é submetida (curva de resfriamento e congelamento), além do processo de pós-descongelamento, ou seja, em última análise, ocorre a diminuição da viabilidade das células, principalmente, porque a membrana espermática é submetida a rearranjos estruturais envolvendo lipídios e proteínas. O sêmen refrigerado não é submetido ao processo de congelamento e descongelamento e, portanto, sofre menos lesões, resultando em maior viabilidade, aumentando a capacidade de fertilizar e de fato aumentando a prenhez quando comparado com o sêmen congelado do mesmo touro [1,6]. Além disso, o momento exato de ovulação, após protocolo de IATF, não é conhecido, ou seja, em outras palavras, há uma janela de tempo, desconhecida, entre inseminação e ovulação que pode diminuir a chance de fecundação quando um sêmen de qualidade inferior é utilizado, consequentemente, quando se utiliza sêmen com viabilidade prolongada, como no caso do sêmen refrigerado, as fêmeas acasaladas por IATF possuem melhores taxas de fertilidade [1].

Estudos envolvendo sêmen refrigerado são comuns em algumas espécies, tais como equinos, caninos, suínos, caprinos e ovinos. Eles abordam questões em relação a composição do diluidor, tempo e temperatura de armazenamento, curvas de refrigeração e taxa de prenhez. No entanto, somente na Nova Zelândia e Irlanda existe o uso “rotineiro” do sêmen refrigerado e de forma comercial. Inclusive, nos últimos anos, os trabalhos com sêmen refrigerado aumentaram por causa dos protocolos de IATF terem melhorado a prenhez do gado leiteiro nesses países.

Os poucos estudos com bovino variam muito a metodologia [7] e necessitam de repetições, para maiores comparações, por exemplo, quando se avalia taxa de prenhez comparando sêmen congelado e refrigerado, qual a concentração espermática utilizada [6,8], tipo de palheta, composição do diluidor [4,9,10,11], tempo e temperatura, processo de refrigeração e de

utilização das palhetas (se aquece ou não antes da IATF), protocolo hormonal, quantidade de touros e fêmeas para ser significativo, etc. De forma resumida, todos os trabalhos verificaram aumento significativo de prenhez, acima de 10%, se utilizado com 24 horas a 5°C, comparado ao sêmen criopreservado [1,2,3,4]. Já os trabalhos divergem quanto a taxa de prenhez se utilizado por 48 horas comparado com o sêmen congelado, sendo que dos dois experimentos na literatura, um encontrou diminuição da prenhez em relação ao sêmen congelado [9], e o outro, índice similar ao congelado [6]. Cabe frizar que a concentração espermática e o processo de refrigeração foram diferentes nesses trabalhos. No entanto, nossos estudos, em andamento, não estão considerando mais a comparação com o sêmen congelado, visto que já foi verificada diferença conforme a hipótese inicial, e o sêmen refrigerado está sendo comparado em diferentes momentos 24, 48, 72 em relação a prenhez. Até agora, os resultados tem mostrado mesmo índice de prenhez com 24 e 48 horas de refrigeração a 5°C e dose inseminante de 30 milhões em palheta fina. Outro resultado interessante é que o diluidor pode conter glicerol (7%) sem afetar a prenhez [2,4,10]. Assim, médicos veterinários podem utilizar o diluidor comercial, que contém glicerol em sua composição, evitando o trabalho de preparo do meio e/ou necessidade de retirada do glicerol.

Próximo passo é, em nossas condições, testar o sêmen líquido, no meio semelhante ao Caprogen e/ou INRA96 [12], para verificar em temperatura ambiente, e com concentração muito menor (somente 5 milhões), quais serão a taxa de prenhez. Daí poderemos obter duas respostas, ambas positivas e satisfatórias. A primeira, se a taxa de prenhez aumentar, e a segunda, se a logividade de utilização do sêmen líquido for maior, quatro dias por exemplo, apresentando taxa de prenhez igual a utilização do sêmen congelado. Vantagens disso seria a otimização de touros, menor custo do sêmen e armazenamento, além da praticidade no momento da inseminação.

Quando seria recomendável?

A escolha dos reprodutores é fundamental para a atividade pecuária, pois é a partir do que é reproduzido que teremos o sistema de produção, seja ele qual for. Considerando que ainda inseminamos de 10 a 12% do rebanho nacional, estamos dizendo que o restante do rebanho brasileiro utiliza monta natural. Com que “tipo” de touros? Um reprodutor permanece, no mínimo, ao redor de seis estações de monta na fazenda, e dependendo da relação touro:vacas e das taxas de prenhez obtidas, o touro tem oportunidade de deixar de 100 a 300 filhos, tornando-o responsável por mais de 90% do ganho genético do rebanho. Em mercado cada vez mais competitivo e especializado, o aumento da prenhez por si só, não traz todos os benefícios quando comparado com o aumento da prenhez junto com o aumento da qualidade dos produtos (bezerros/bezerras mais pesados por exemplo). Dessa forma, o objetivo principal do uso de uma genética melhoradora, por meio de reprodutores superiores é melhorar características do rebanho com grande impacto econômico, como o desempenho em ganho de peso, precocidade, habilidade materna, fertilidade, etc. Ou seja, o pecuarista busca profissionalizar seu negócio aumentando produção e produtividade. Nesta situação, touros melhoradores são cada vez mais utilizados para agregar valor à progênie. Assim, a aquisição

desses reprodutores deve estar associada à otimização de seu uso, pois os custos por prenhez aumentam muito quando a relação touro:vacas é desfavorável. Outro fator que tem grande influência no custo da prenhez é a fertilidade do rebanho. Por isso, o aumento de prenhez traz o rápido retorno do capital investido no reprodutor. Em outras palavras, estamos dizendo que em propriedades que utilizam IATF e investem em touros melhoradores para repasse, esses reprodutores poderiam ser os doadores de sêmen refrigerado para a coleta agendada, por exemplo. Pecuaristas que são produtores de touros melhoradores, também são um mercado potencial para a utilização de sêmen refrigerado, já que os acasalamentos são dirigidos e muitas vezes com seu próprio animal.

O manejo reprodutivo é essencial para saber sobre o retorno econômico da propriedade, assim as várias opções de manejo (somente monta natural, ou IATF e repasse, ou IATF com o sêmen refrigerado desses touros melhoradores, que ainda poderão ser utilizados para repasse), que dependerão do valor investido no animal, da taxa de prenhez do rebanho, da relação touro:vacas, do retorno econômico baseado no peso à desmama, dos reflexos até o abate (descarte de machos e fêmeas) e sobre o rebanho de cria, considerando-se os ganhos relativos a peso corporal, qualidade das carcaças e das fêmeas de reposição, etc. Esta abordagem permite reduzir o número de espermatozoides por dose, otimizando o uso de touros com alto mérito genético, especialmente em programas de IATF [8,11].

Considerações Finais

Não tenho dúvida que o sêmen refrigerado terá espaço crescente e considerável dentro do manejo reprodutivo, tanto para os profissionais que atuam na prestação de serviço de IATF, quanto para os Centros de Coleta e Processamento de Sêmen, pois as principais vantagens relacionadas com seu uso são a otimização de touros, menor custo do sêmen e armazenamento e, sua praticidade e aumento de prenhez na IATF. Outra vantagem importante do sêmen refrigerado é a possibilidade do produtor investir na compra de animais melhoradores (uso de touros geneticamente superiores) maximizando o seu uso, além da possibilidade de utilizar touros avaliados e de interesse econômico, mas que não passariam no processo de criopreservação, seja pelo próprio processamento do sêmen e/ou excesso de patologia espermática. No entanto, espera-se que essa nova linha de pesquisa avansse com contribuições em relação ao melhor diluidor, concentração espermática, tempo e temperatura ideais para prolongar a viabilidade espermática, efeito indivíduo, porcentagens de patologias espermáticas, momento de capacitação espermática e ovulação. Ou seja, ATÉ HOJE, aos princípios que norteiam pesquisas para maximizar o processo de congelamento do sêmen, são os mesmos para otimizar o processamento para o sêmen refrigerado, com uma grande diferença, todos os trabalhos antigos em relação ao sêmen refrigerado, foram testados em outra condição fisiológica que era o cio natural. Quando lá na introdução foi dito quebra de paradigmas, talvez tenhamos que tocar numa ferida maior, e pensar que HOJE, a resistência do assunto esteja mais do lado da própria “comunidade científica” (em achar que é uma biotécnica ultrapassada), do que na realidade do campo, e já, em escala.

Referências Bibliográficas

- [1] BORGES-SILVA, J.C., SILVA, M. R., MARINHO, D. B., NOGUEIRA, E., SAMPAIO, D. C, OLIVEIRA, L. O. F, ABREU, U.G.P., MOURAO, G.B., SARTORI, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 28 n. 7 p. 1004-1008, 2015.
- [2] SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; RESENDE, O. de A.; SAMPAIO, D. C.; NOGUEIRA, E.; ABREU, U. G. P. de; OLIVEIRA, L. O. F. de; RODRIGUES, W. B.; SARTORI FILHO, R. Sêmen bovino refrigerado e aumento de prenhez de vacas de corte submetidas à IATF. (Embrapa Pantanal. **Circular Técnica**, 114). 9p. 2017. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169514/1/CT-114.pdf>
- [3] CRESPILO, A.M., PAPA, F.O., SANTOS, M. P., SÁ FILHO, M.F. Use of cooled bull semen as strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. **American Journal of Animal and Veterinary Science**. 4, 7, 175-179, 12, 2012.
- [4] PAPA, M.P., MAZIERO, R. M., GUASTI, P. N., JUNQUEIRA, C. R., FREITASDELL'AQUA, C. P., PAPA., F. O., PAPA., F. O., VIANA, F. P., ALVARENGA, M. A., PAPA., F. O. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**. 83, 107-113, 8, 2015
- [5] GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H. et al. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação de GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo-fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3,p.342-344, 1999.
- [6] TARRAGÓ, O. F. B. **Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF?** Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, 2017.
- [7] SILVA, J. C. B.; NOGUEIRA, E.; SILVA, M. R. Processamento de sêmen bovino refrigerado. (Embrapa Pantanal. Comunicado Técnico, 108) 6p. 2017. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/173024/1/COTJuliana-formatado-final-07fev2018.pdf>
- [8] BUCHER, a.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KÄHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 7, p. 1180–1185, 2009.
- [9] CRESPILO, A.M., NICHI, M., GUASTI, P.N., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., SÁ FILHO, M.F., MAZIERO, R.R., FREITAS-DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O. Sperm fertility 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**. 146, 126-133, 3, 2014.
- [10] SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; OLIVEIRA, L. O. F. de; ABREU, U. G. P. de; MARINHO, D. B.; SARTORI, R. Sêmen bovino refrigerado utilizado na IATF contendo ou não glicerol no diluidor. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, **Anais...** 30.,p. 209 2016, Foz do Iguaçu. Proceedings... Foz do Iguaçu: SBTE, 2016. <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153513/1/SP18396.pdf>
- [11] VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 912–922, 2005.

Agradecimentos: Às propriedades parceiras BR PEC e EMA Pantanal.

Processamento de sêmen e fertilidade em ovinos e caprinos

Leandro Rodello
rodellovet@gmail.com

A aplicação de biotécnicas de reprodução assistida em pequenos ruminantes, como a criopreservação de sêmen, inseminação artificial (IA), transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV), têm sido muito importante para o aproveitamento do potencial genético de animais geneticamente superiores, promovendo maior impacto aos programas de melhoramento animal.

O processo de criopreservação é extremamente complexo e vários são os fatores que podem influenciar seus resultados, havendo sempre uma subpopulação de espermatozoides não adaptados a tal processo.

A criopreservação dos espermatozoides de muitas espécies leva a uma série de alterações que potencialmente pode resultar em marcante redução da fertilidade quando comparada a do sêmen a fresco. As lesões nas membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial foram indicadas como as principais causas de danos estruturais e de perdas funcionais, impostas pela criopreservação (VALCARCEL, 1997).

Segundo Salamon e Maxwell (1995) apesar de 40 a 60% dos espermatozoides de carneiros apresentarem motilidade pós-descongelamento, somente 20 a 30% deles permanecem biologicamente inalterados. Os danos básicos que os espermatozoides sofrem durante o processo de congelamento/descongelamento podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. Os espermatozoides podem estar móveis, mas danificados, de tal maneira que a fertilização seja improvável.

Segundo Singer e Nicholson (1972), o modelo estrutural básico das membranas espermáticas é a de um mosaico fluído, formado por duas camadas de fosfolipídios, não sendo uma estrutura contínua, por ser interrompida por numerosas proteínas integrais, intercaladas nesta estrutura. Na maior parte da membrana, a organização de lipídios, glicolipídios, proteínas e glicoproteínas apresenta-se de maneira assimétrica em relação à distribuição de moléculas específicas nas faces externa e interna. As proteínas e glicoproteínas da membrana celular são dispostas de forma heterogênea e que podem ser divididas em duas classes distintas: integrais ou intrínsecas e periféricas ou extrínsecas.

O estado de fluidez das membranas espermáticas é um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam a fluidez são a composição relativa de fos-

folipídios/colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta. Os lipídios e as proteínas de membrana que permanecem em um estado de fluidez, permitindo assim, a movimentação livre dos componentes na membrana sofrem com a queda contínua de temperatura durante a congelação. As mudanças de temperatura produzem alterações físicas da membrana fazendo com que ela passe do estado líquido ao de gel, tornando-se uma estrutura rígida, com áreas fracas e susceptíveis a rupturas (HAMMERSTED et al., 1990).

Este fenômeno pode assumir proporções exageradas durante a refrigeração, onde alguns lipídios atingem temperaturas transacionais bem antes dos outros, levando a uma dispersão rápida da fase de gel (WOLFE et al., 1998).

Alterações na motilidade e na estrutura dos espermatozoides ocorrem simultaneamente nas diferentes etapas de congelação e descongelação. É bem conhecido que o resfriamento rápido do sêmen de 30 para 0°C (WATSON, 2000), ou até mesmo a redução rápida da temperatura de 37°C para 5°C induz a um estresse letal para algumas células, que é proporcional à taxa de resfriamento, intervalo de temperatura e ao limite de temperatura atingido. Este processo é conhecido como choque térmico (WATSON, 2000).

No choque térmico as alterações incluem o decréscimo da utilização glicólise, da frutólise e conseqüentemente, redução da respiração celular, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucléico (DNA) e liberação de enzimas e lipídios para o meio extracelular, a partir dos espermatozoides. Essas alterações estão associadas com a geração de estresse oxidativo e de espécies reativas de oxigênio - ROS (CHATTERJEE et al., 2001). As lesões estruturais iniciam-se na membrana plasmática atingindo posteriormente a membrana acrossomal e por último às membranas mitocondriais (WATSON, 2000).

Os efeitos da congelação/descongelação na função espermática são semelhantes aos da capacitação espermática, devido ao aumento da permeabilidade das membranas e aumento da produção de ROS (MEDEIROS et al., 2002).

Alguns dos elementos do citoesqueleto também são termo-sensíveis. A congelação das células resulta em uma despolimerização dos filamentos de actina. Segundo Spungin et al. (1995) e Brener et al. (2003), a despolimerização da F-actina do citoesqueleto é uma etapa importante da capacitação e da reação acrossomal, permitindo a aproximação das membranas plasmática e acrossomal promovendo a exocitose das enzimas acrossomais, então a criopreservação contribui para a desorganização das membranas antecipando o processo de capacitação e reação acrossomal (BRENER et al., 2003).

Referências Bibliográficas

BRENER, E., RUBINSTEIN, S., COHEN, G., SHTERNALL, K., RIVLIN, J., BREITBART, H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Biological Reproduction**, v.68, p.837-45, 2003.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.452-458, 2001.

HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

MEDEIROS, C.M.O., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T.D., RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. Review I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. **Animal Reproduction Science**, v.37, p.185-249, 1995.

SINGER, S.J.; NICHOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cells membranes. **Science**, v.175, p.720-731, 1972.

VALCÁRCEL, A., DE LAS HERAS, M. A., PÉREZ, L., MOSES, D.F., BALDASSARRE, H. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v.45, p.299-309, 1997.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-1, p.481-492, 2000

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S; JONES, R. regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p. 1506-1514, 1998.

Processamento de Sêmen e Fertilidade em Pequenos Animais

Maria Isabel Mello Martins

Reproa / UEL- Universidade Estadual de Londrina, e-mail: imartins@uel.br

Abstract: In small animals artificial insemination (I.A), chilled and frozen semen are the most applied assisted reproduction. Although the I.A. in these species have been more applied the semen cryopreservation remains the objective of many studies, since an ideal model has not yet been defined. Chilled semen provides higher rates of gestation than frozen semen, however it can not be stored for long periods. Post-thaw sperm quality assessment should include the ability to fertilize sperm and good fertility results are drastically dependent on the knowledge of reproductive physiology particularities of canine and feline females

Keywords: dogs and cats; criopreservação; fertilidade.

Palavras-chave: cães e gatos; criopreservação; fertilidade.

Introdução

A eficiência reprodutiva pode ser impulsionada com a aplicação das biotécnicas da reprodução, com a identificação de reprodutores mais férteis, que com o auxílio de métodos artificiais melhoraram a fertilidade nas espécies estudadas. Dentre as biotécnicas da reprodução, as mais aplicadas em pequenos animais são a inseminação artificial (I.A) a refrigeração e congelamento de sêmen. Embora a I.A. em cães venha sendo mais aplicada nas últimas décadas, e em gatos nos últimos anos, a criopreservação de sêmen nessas espécies continua sendo objetivo de muitos estudos, pois um modelo ideal ainda não foi definido. A criopreservação espermática pode ser por meio da refrigeração a 4 a 15°C ou congelamento a -196°C. O sêmen refrigerado proporciona taxas mais altas de gestação do que o sêmen congelado, entretanto não pode ser armazenado por longos períodos. A congelamento das células espermáticas permite que sejam armazenadas por longos anos, entretanto prejudicam a viabilidade celular e consequentemente diminui a fertilidade. Na linha do tempo das descobertas que proporcionaram a congelamento espermática, o monge italiano Spallanzani (1776) foi o primeiro a reduzir, de maneira reversível, a atividade metabólica dos espermatozoides com a diminuição da temperatura, possibilitando a armazenagem do sêmen. Mais de dois séculos é o interstício de tempo até Polge e colaboradores, em 1949, identificarem a ação crioprotetora do glicerol, impactando positivamente nos resultados de congelamento espermática. O primeiro sucesso na congelamento de sêmen de cães foi publicado por Rowson em 1954, entretanto, somente em 1969 Seager relatou a primeira gestação com sêmen congelado em cadela (ENGLAND,

1993). A primeira notificação ao *American Kennel Club* de nascimento de filhote produto de I.A. foi em 1982, sendo que em 1985 foi notificada a primeira gestação de cadela resultante de I.A. no Brasil. O registro de ninhadas produto de inseminação de cadelas com sêmen congelado deve ser junto a Confederação Brasileira de Cinofilia (CBKC, <http://www.cbkc.org>), e deve seguir algumas normas. Quanto à congelação de sêmen e inseminação artificial em felinos, não há regulamentações específicas, sendo que, no Brasil essas biotécnicas têm sido realizadas quase que exclusivamente em laboratórios de pesquisas em Universidades.

Criopreservação do Sêmen

Os métodos empregados na criopreservação das células espermáticas em pequenos animais se baseiam em cinco etapas: 1) diluição e refrigeração; 2) penetração do crioprotetor e envasamento; 3) congelação; 4) armazenamento e 5) descongelação (HAMMERSTEDT et al., 1990). Os diluentes utilizados para congelação de sêmen devem conter uma fonte de energia para o metabolismo espermático (glicose, frutose, lactose); uma substância tampão, que evite as alterações de pH e mantém a osmolaridade (TRIS/ácido cítrico, TES/citrato, glicina); antibióticos que inibem o crescimento bacteriano (penicilina, estreptomomicina, neomicina, lincomicina, amicacina); substância que proteja a membrana espermática do choque térmico na refrigeração (gema de ovo, leite, lecitina de soja); e substância crioprotetora que penetre na célula espermática e diminua os danos que resultam da congelação e descongelação (LINDE-FORSBERG, 1991; ENGLAND, 1993; BATEMAN, 2001). Uma série de diluentes comerciais para cães tem sido desenvolvidos e estão disponíveis, entre eles o Triladyl Canine Extender® (Minitube, Alemanha), CaniPlus Chill® (Minitube, Alemanha) CaninePlus Freeze® (Minitube, Alemanha), Clone® (Cryogenic Laboratories of New England Inc., UK), diluentes da Synbiotics® (Synbiotics Corporation, Kansas City, MO, USA), Biociphos® W482 (IMV Technologies, França), Laiciphos® 478 (IMV Technologies, França), ACP® (água de coco em pó, ACP Serviços Tecnológicos Ltda, Fortaleza, CE, Brasil), DCR® e DC Crio® (Inpreha Biotecnologia, Jaboticabal, SP, Brasil). Alguns diluentes, desenvolvidos para outras espécies, tem sido utilizados com resultados bons tanto em cães como gatos, como o Triladyl® (Minitube, Alemanha), Biladyl® (Minitube, Alemanha), Botu-semen® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) Botucrio® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). Uma outra opção, são os meios diluentes preparados pelos técnicos, sendo mais utilizados em universidades e centros de pesquisa. Independente do diluente, o importante é o pH estar entre 6,8 e 7,0 e a osmolaridade entre 280 a 300 mOsmol. É fundamental para o sucesso da criopreservação do sêmen que haja o conhecimento das características seminais, das substâncias que protegem e desestabilizam a membrana espermática, e do processo a ser utilizado para o armazenamento espermático. O plasma seminal, que entra em contato com o espermatozoide no momento da ejaculação, possui algumas proteínas que se ligam à membrana espermática, e estão associadas à fertilidade e crioproteção dos espermatozoides. A identificação das proteínas plasmáticas, inicialmente realizada pela eletroforese unidimensional em 1957 por Bertok e Pasztor, tem sido estudada nas diferentes espécies. Souza (2003) identificou correlação positiva entre a densitometria de duas bandas proteicas seminais(67kDa e 58,6kDa) e a fertilidade in vitro. Em um estudo realizado com congelabilidade de sêmen em cães, o animal que apresentou melhores

resultados na avaliação espermática pré e pós congelção possuía densitometria mais baixa da banda proteica de 15,29kDa, sugerindo que essa proteína pode estar ligada à membrana espermática de cão, protegendo-a do estresse da criopreservação (Martins, 2005). Entretanto, outras proteínas e microelementos que parecem exercer efeito deletério nas células espermáticas durante o processo de criopreservação, diminuindo a motilidade. Portanto, a remoção do plasma seminal por meio a centrifugação do ejaculado pode melhorar os resultados da criopreservação, que é um método artificial de interrupção da maturação espermática, mas também interfere negativamente na fertilização. O período de refrigeração de sêmen de cão é variável, sendo o mais comum a 4°C a 5°C por 48 a 96 horas. Para gatos, a refrigeração espermática não tem período estabelecido, sendo a maioria das publicações experimentais. Em relação a congelção e descongelção de sêmen, o que é postulado é que se a curva de congelção for rápida a descongelção deve ser rápida e quando a congelção for lenta e descongelção deve ser lenta (Hammerstedt et al.,1990). Em cães, o sêmen geralmente é congelado em palhetas francesa de 0,5mL, e a descongelção em banho-maria realizada a 46°C por 15 segundos ou 70°C por 8 segundos quando a congelção é realizada em uma etapa (amostra é diluída em diluente com crioprotetor, envasada e depois colocada para refrigerar), e quando a congelção é realizada em duas etapas (amostra é diluída em diluente sem crioprotetor, após a refrigeração é realizada a glicerolização e depois envasada), a descongelção é na temperatura de 37°C por 30 segundos. Nos felinos a congelção é geralmente realizada em palhetas de 0,25mL, Em uma etapa, sendo a descongelção em banho-maria na temperatura de 37°C por 30 segundos ou 46°C por 15 segundos.

Avaliação da Qualidade Espermática

Os resultados da cinética e morfologia espermática pós-descongelção nos cães e gatos, independente dos diluentes e protocolos, apresentam uma variabilidade individual muito grande.

A taxa de declínio da qualidade espermática pode ser diferente para cada parâmetro espermático durante a refrigeração, de acordo com o tempo, sendo que a morfologia espermática é o parâmetro que se deteriora mais rapidamente. A congelção/descongelção de espermatozoides de gatos obtidos da cauda de epidídimo ocasiona lesão de integridade de membrana em 20 a 70% das células espermáticas (Hay e Goodrowe, 1993; Lengwinat e Blottner, 1994; Martins et al., 2006; Macente et al., 2012;). Em estudo realizado com congelção/descongelção de sêmen de cães reprodutores férteis, os resultados de alterações morfológicas espermáticas ficaram acima dos 20%, aceitável pelo CBRA (2013), entretanto a porcentagem de normais foi maior que 61% (Martins, 2005). Segundo Oettle (1993) a fertilidade só é comprometida quando a porcentagem de espermatozoides normais encontra-se abaixo de 60%. A presença de inserção abaxial da peça intermediária em cães, embora não seja considerado defeito espermático (Mies Filho, 1987), pode propiciar maior fragilidade ao espermatozoide quando este for submetido ao estresse da criopreservação. A motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para avaliar a qualidade do sêmen. Entretanto, a avaliação das características da cinética dos espermatozoides permite conhecer o movimento

espermático, pois ao se considerar os valores médios de motilidade, assume que o ejaculado é uniforme, mascarando os diferentes estados bioquímicos das células espermáticas (Abaigar et al., 1999; Mortimer, 2000; Holt; Harrison, 2002; Martínez-Pastor et al., 2011). A avaliação espermática por meio da análise computadorizada (sistema CASA) permite identificar as características do movimento dos espermatozoides; de uma forma eficaz, rápida e objetiva o equipamento, considerando o *setup* da espécie, analisa os parâmetros cinéticos individuais de cada espermatozoide, propiciando o conhecimento das subpopulações espermáticas, as quais podem ser indicadores da qualidade do sêmen. Estudos têm indicado que espermatozoides com movimentos rápidos e lineares são mais resistentes à criopreservação e tem maior probabilidade de fertilizar o oócito (Mendonza et al., 2012; Ferraz et al, 2014).

Avaliação da Fertilidade Pós Criopreservação

A avaliação da qualidade espermática pós-descongelamento deve incluir a capacidade de fertilizar dos espermatozoides. Em relação a espermatozoides epididimários, resultados positivos foram obtidos ao ser avaliada a capacidade de ligação em zona pelúcida homóloga (Kashiwazaki et al., 2005; Martins et al, 2006), foi conseguido desenvolvimento embrionário *in vitro* até o estágio de blastocisto (Thuwanut et al., 2010), assim como obtenção de ninhadas após a inseminação artificial intrauterina (Tsutsui et al., 2003). Quanto a resultados de gestação com sêmen pós-descongelamento, em gatos, experimentalmente a I.A. intrauterina por laparotomia resultou em 75% de gestações, com o nascimento de ninhadas (Villaverde et al, 2009). Em centros de reprodução na Europa cada vez mais tem sido procurado esse tipo de assistência reprodutiva para felinos domésticos, entretanto no Brasil, ainda são raros os criadores que buscam as biotécnicas da reprodução para gatos domésticos. Em relação aos cães, a utilização do sêmen refrigerado é mais comum, com resultados positivos de gestação semelhantes aos obtidos com a I.A. com sêmen a fresco. Embora os resultados positivos de gestação com sêmen congelado sejam promissores, o uso da biotécnica ainda é restrito a canis que utilizam sêmen importado. Quanto a reprodução assistida em cães, a principal dificuldade é o controle do ciclo estral das cadelas e o fato dessa espécie ovular oócito imaturo, sendo necessário identificar o momento de maior fertilidade, e quanto a espécie felina, a maior limitação é o fato da maioria das gatas apresentarem ovulação induzida e, portanto, o sucesso da I.A. é dependente da indução da ovulação mecânica ou farmacológica.

Considerações Finais

O sucesso da criopreservação espermática de cães e gatos depende do conhecimento das características das espécies, para que seja aplicado o diluente e o método de refrigeração e/ou congelamento mais adequado. Embora os espermatozoides dessas espécies sejam resistentes às mudanças de temperatura é essencial que seja evitado o choque térmico, que as condições de higiene e o controle sanitário dos animais sejam rígidos. Os resultados positivos de fertilidade são drasticamente dependentes do conhecimento das particularidades da fisiologia reprodutiva das fêmeas caninas e felinas.

Referências Bibliográficas

- [1] ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl. 47, p.243-55, 1993.
- [2] HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.
- [3] LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. In: **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. Canine Reproduction. 1991, p. 467-85.
- [4] BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival**. Guelph, 2001. 50p. Thesis (master). University of Guelph
- [5] MARTINS MIM. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. Botucatu, 2005. 120p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, área de Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, UNESP.
- [6] SOUZA, F.F. de. **Caracterização eletroforética do perfil protéico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. Botucatu, 2003. 98p. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- [7] HAY, M. A., GOODROWE, K. L. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, 297-305, 1993.
- [8] LENGWINAT, T.; BLOTTNER, S. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.35, p.291-301, 1994.
- [9] Martins MIM, Justino RC, Pereira FD, Perches CS, Chirinéa VH, Lopes MD. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epidymis of dogs and cats: preliminary results. **Anim Reprod**, v.3, p.265, 2006. Resumo.
- [10] MACENTE, B; MANSANO, C; PEREIRA, M; MARTINS, M; GIOSO, M; SAVI, P; GUTIERREZ, R. Congelamento de espermatozoides epididimários de gatos utilizando o diluidor botu-crio® após refrigeração por 24 h em contêiner de transporte de sêmen botu-tainer®. **Acta Veterinaria Brasileira**, v.6, n.2, p.112-117, 2012.
- [11] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3th ed. Belo Horizonte; 2013.
- [12] OETTL, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 47, p.257-60, 1993.
- [13] MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**, Inseminação artificial nos cães. 6.ed. Porto Alegre: Sulina. 1987, 750p.
- [14] Abaigar T, Holt W, Harrison R, Del Barrio G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biol Reprod**, v.60, p.32-41, 1999.
- [15] Mortimer ST. Casa – Practical aspects. **Journal of Andrology**, v.21, p.515-24, 2000.
- [16] Holt WV, Harrison RAP. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase A-dependent pathway: between-cell and between-ejaculate differences are not due to deficiencies in protein kinase A activation. **Journal of Andrology**, v.23, p.557-565, 2002.
- [17] Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, Paz P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. **Theriogenology**, v.75, p.783-795, 2011.
- [18] Mendoza N, Casao A, Del Valle I, Serrano E, Nicolau S, Assumpção MEOA, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA, Pérez-Pé R. Quality characteristics and fertilizing ability of ram sperm subpopulations separated by partition in an aqueous two-phase system. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v.880, p.74-81, 2012.

- [19] Ferraz MAMM, Morató R, Yeste M, Arcarons N, Pena AI, Tamargo C, Hidalgo CO, Muiño R, Mogas T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to in vitro sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology**, v.81, p.1067-1072, 2014.
- [20] KASHIWAZAKI, N.; YAMAGUCHI, R.; UESUGI, R.; HISHIYAMA, N.; KIM, M.; NAKATSUKASA, E.; KOJIMA, Y.; OKUDA, Y.; HISAMATSU, S.; INOMATA, T.; SHINO, M. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zonapellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, n. 6, p.735-739, 2005.
- [21] THUWANUT, P; CHATDARONG ,K; JOHANNISSON ,A; BERGQVIST,A; SO"DERQUIST, L; AXNE´R, E. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. **Theriogenology**, v.73, p. 1076–1087, 2010.
- [22] TSUTSUI, T., WADA, M., ANZAI, M., HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **J. Vet. Med. Sci.** v. 65, p. 397-9, 2003.

Exame clínico-andrológico para seleção de touros jovens

Eliane Vianna Costa e Silva¹

Luiz Carlos Cesar Costa Filho²

Fernanda Battistotti Barbosa³

Marcos Vargas da Silveira⁴

Ellen Caroline Soligo²

Alini Silva Peixoto²

Tallita Silva de Assis Sales⁴

Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo⁵

Joana Carolina Trindade Barbosa⁵

Ludomir Zalesky⁶

Luís Carlos Francisco da Silva⁶

Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul,
GERA-MS/CNPq, Campo Grande, MS

O exame clínico andrológico é realizado para fins de avaliação do potencial de fertilidade de touros na vida adulta. Em animais jovens, como rotina é realizado em média a partir dos 14 meses para touros europeus e 18 meses nos zebuínos para venda e como seleção pré-estação de monta. Nestes casos a abordagem é essencialmente biológica e sua interpretação, clínica.

Dentre as espécies domésticas de produção, o bovino tem o ciclo mais longo. Para diminuir o ciclo de produção, a seleção é essencial. Um dos pontos de estrangulamento está na idade de entrada dos animais em reprodução, que contribui com o aumento na vida reprodutiva dos animais e, como consequência, maior produção do número de bezerros, beneficiando toda a cadeia produtiva (Cardoso & Nogueira, 2007).

Segundo Costa e Silva & Costa Filho (2017), um tourinho que entre em puberdade precocemente pode alcançar sua maturidade sexual em tempo de ser utilizado para reprodução ainda na EM2, Figura 1. Obviamente que a melhor perspectiva para um touro nesta idade será ter o sêmen coletado e criopreservado, possibilitando que aos 24 meses este animal já tenha filhos nascidos, diminuindo o intervalo entre gerações. Um touro que entre em pu-

¹ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; email: eliane.silva@ufms.br

² Médicos Veterinários, PROCRIAR Assistência Veterinária, Campo Grande, MS

³ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal/UFMS

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFMS

⁵ Acadêmicos de graduação em Medicina Veterinária/UFMS

⁶ Técnicos do Laboratório de Reprodução Animal / FAMEZ/UFMS

berdade após os 15 meses já diminuiria bastante a possibilidade de sua utilização na mesma EM, uma vez que a maturidade sexual muito provavelmente seria alcançada ao final da EM2, portanto mesmo que emprenhe fêmeas neste seriam as mais tardias do rebanho e o número de filhos prováveis muito menor. Já um animal que entre em puberdade após os 17 meses só poderá ser utilizado na EM3, portanto tendo filhos nascidos apenas após os 36 meses de idade. A possibilidade de eliminar a fase de recria de um touro gera uma economia substancial na produção de touros além de acelerar o processo de melhoramento genético.

Com essa visão, a busca por animais mais precoces que possam ser utilizados já aos 12 meses começa a ultrapassar os desafios de precocidade das fêmeas e se estende aos machos. Em raças zebuínas até a poucos anos atrás a utilização de touros com um ano de idade poderia ser considerado um mito. No entanto, trabalhos de seleção bem direcionados tem mostrado que este sonho é hoje uma realidade. E é esta história que este trabalho pretende contar.

Em programas de melhoramento genético no Brasil, a ênfase de seleção para PE era na medida feita aos 18 meses; entretanto, a partir de 1998, um trabalho com machos Nelore mostrou que o ponto de inflexão (crescimento máximo) na curva de crescimento do PE acontece aos 10,8 meses, o que, segundo os autores, evidenciaria o maior crescimento do parênquima testicular próximo aos 12 meses, sugerindo o início da puberdade (Bergmann et al., 1998).

Correlações genéticas favoráveis (quando as duas características são melhoradas) entre PE aos 12 meses e data do primeiro parto (-0,08) e desfavoráveis entre PE aos 18 meses e idade ao primeiro parto (0,21), evidenciam que a puberdade dos machos também ocorreria por volta dos 12 meses de idade (Gressler et al., 1998).

Se a seleção for realizada com a medida aos 18 meses a maioria dos touros jovens já estará no período pós-púbere, e a seleção para maiores medidas de PE nessa idade, está associada aos maiores pesos corporais e, possivelmente, à menor precocidade reprodutiva em ambientes tropicais (Gressler et al., 1998; Quirino & Bergmann, 1998).

Em ambos os sexos, a idade à puberdade, é indicadora de precocidade sexual dos animais, é sumamente importante na seleção reprodutiva, e deve ser considerada ponto relevante nos programas de melhoramento das raças zebuínas (Bergmann, 1999). A herdabilidade da idade à puberdade é considerada alta (0,61), o que indica a possibilidade de ser utilizada como fator de seleção (MacNeil et al., 1984).

Fatores genéticos, condições nutricionais pré e pós desmama, manejo e até linhagem dentro da raça, podem definir direta, e indiretamente, se o animal terá condição de iniciar a puberdade mais precocemente ou não (Garcia et al., 1987).

Em 2008, o GERA-MS iniciou um trabalho de seleção para precocidade sexual no rebanho de bezerros machos Nelore do Grupo Genética Aditiva. Nossa hipótese é que diante do perfil de exame andrológico que observávamos nos animais a partir dos 16 meses teríamos indivíduos púberes abaixo dos 14 meses e que a seleção coleta de sêmen seria mais efetiva do que somente pelo perímetro escrotal.

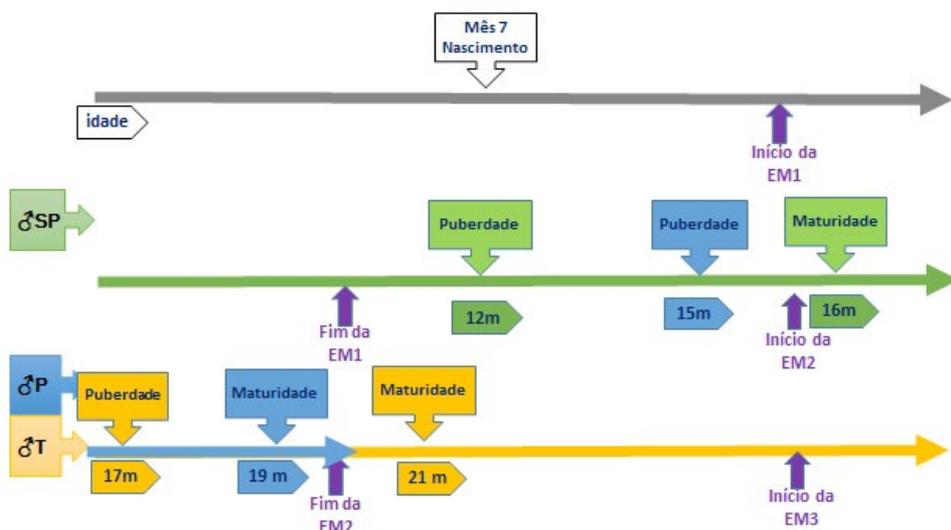


Figura 1. Projeção de utilização de touros de acordo com sua precocidade sexual: SP (em verde, superprecoce, púberes ≤ 14 meses); P (em azul, precoce, púberes entre 14 a 17 meses) e T (tradicional, em laranja, púberes >17 meses) (Costa e Silva e Costa Filho, 2017).

No entanto é preciso levantar algumas questões importantes no que tange aos contrastes entre avaliação clínica e zootécnica quando se trata de animais jovens.

Tem sido observado uma incoerência entre perímetro escrotal e idade a puberdade. A máxima de que animais de maior Perímetro são os mais precoces não tem apresentado a consistência necessária. Em um universo de 4000 touros observamos que a dispersão do perímetro escrotal diferia entre as diferentes classes de precocidade sexual (Figura 2). Os animais mais tardios apresentam dispersão maior do perímetro escrotal à puberdade dos que os precoces e superprecoces. Observa-se touros púberes na classe superprecoce com perímetro escrotal que variam entre 23,5 e 37 cm. E muitas vezes touros com mesma idade e perímetro escrotal apresentam condições fisiológicas diferentes de desenvolvimento sexual. Assim como o efeito de fazenda (manejo nutricional e seleção) sobre o desenvolvimento do perímetro é visível na Figura 3, em que se observa que fazendas com maior pressão de seleção para perímetro escrotal e peso apresentando PE médio/classe mais alto do que outras. Apesar de nesta figura termos fazendas que usam linhagens muito similares.

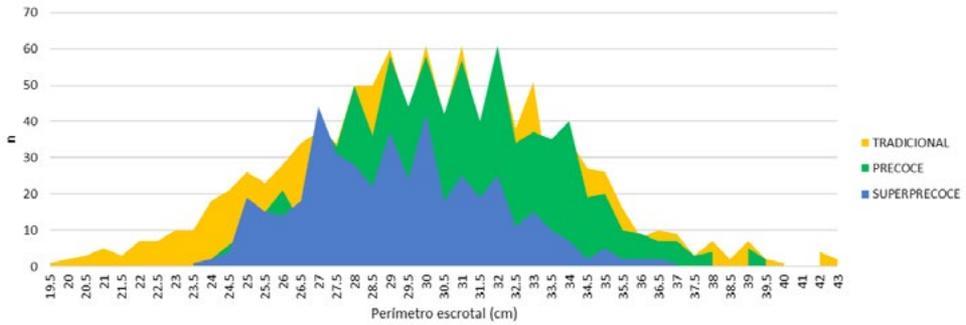


Figura 2. Variação do Perímetro escrotal de acordo com a precocidade sexual de touros Nelore (n=4700): SP (em verde, superprecozes, púberes ≤14 meses); P (em azul, precoces, púberes entre 14 a 17 meses) e T (tradicional, em laranja, púberes >17 meses).

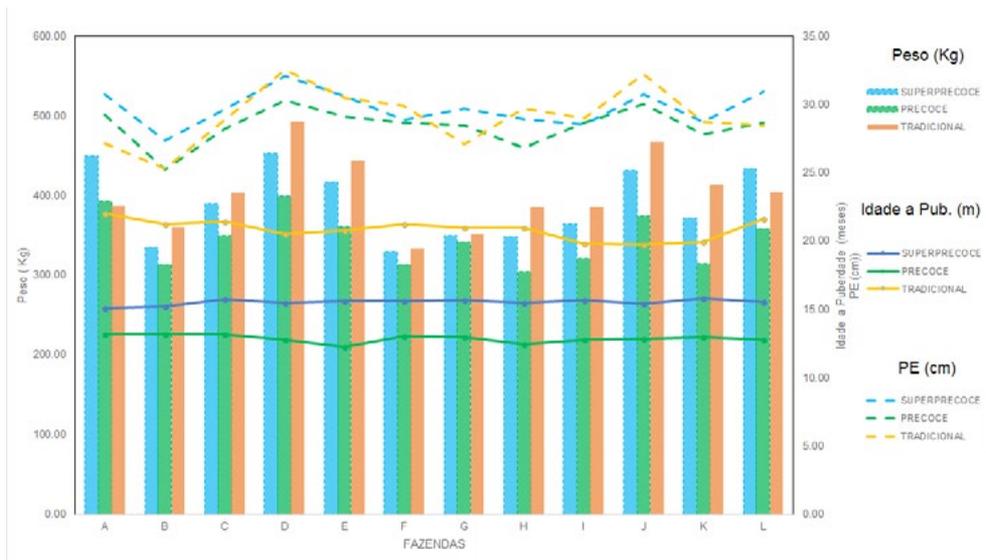


Figura 3. Variação do Perímetro escrotal, peso e idade a puberdade entre fazendas de acordo com a precocidade sexual de touros Nelore (n=4700): SP (em verde, superprecozes, púberes ≤14 meses); P (em azul, precoces, púberes entre 14 a 17 meses) e T (tradicional, em laranja, púberes >17 meses).

Com o objetivo de selecionar melhor e mais cedo o que pode ser feito além de medir perímetro escrotal, estratégia utilizada até hoje, a cada três meses desde a desmama? O que propomos é que se faça exame andrológico no animal jovem, a partir da desmama. É óbvio que neste caso não há o propósito de descarte por exame andrológico, mas o uso do recurso clínico para diagnóstico da fase do desenvolvimento sexual. Neste caso o exame compõe-se de exame clínico da genitália externa, com biometria testicular, ultrassonografia testicular e tentativas de coleta que realizamos a partir de 19cm de perímetro escrotal.

A estratégia de coleta, é importante lembrar, é diferente da estimulação que se faz no animal adulto, sendo necessário muito mais atenção e suavidade nos estímulos. Não trabalhamos com estímulos de frequência alta e amplitude baixa no início para quando iniciar a liberação do sêmen diminuir a frequência e aumentar a amplitude. A frequência é estável e a amplitude embora seja crescente alcança limiares muito baixos, sendo extremamente importante observar os limiares de sensibilidade do animal para estabelecer o ritmo da coleta. O volume do ejaculado é importantíssimo, pois a definição de idade a puberdade depende da concentração total do ejaculado. Adotamos o conceito de puberdade de Wolf et al (1965): estará púbere o animal que apresenta em seu ejaculado motilidade progressiva $\geq 10\%$ e concentração espermática total de, no mínimo, 50 milhões de espermatozoides.

Além disso realizamos avaliações ultrassonográficas sucessivas com intervalos de 3 meses, sendo a primeira após a desmama, acompanhando as pesagens e mensurações dos programas de melhoramento genético.

Ultrassonografia testicular

Temos utilizado a ultrassonografia como uma estratégia para acompanhar as alterações do parênquima testicular a partir da desmama. As imagens ultrassonográficas são obtidas a partir da desmama em sequência de quatro avaliações intercaladas por 90 dias feitas sempre com o mesmo equipamento, sonda linear de 7,5 MHz, em que se obtém uma imagem no plano longitudinal-lateral. É uma estratégia simples e não invasiva. A densidade de pixels é lida em software próprio e a curva é analisada individualmente.

Hormônio anti-Mulleriano

A dosagem do nível do hormônio Anti-Mülleriano (AMH) constitui uma forma útil na detecção de puberdade precoce (baixas concentrações de AMH) e puberdade tardia (altas concentrações de AMH) em humanos (Rey et al., 1993; Okay, 2003). Em bovinos *Bos indicus* (Nelore), a concentração sérica do AMH em animais não púberes é elevada, comportamento esse inverso ao da T.

Nos animais púberes acontece uma inversão dessas concentrações, em que os níveis de AMH são reduzidos e os da T se elevam, resultados esses que demonstram que o AMH também revela-se como um possível marcador biológico de precocidade sexual em machos bovinos (Queiroz, 2014). Já vimos que não há ritmo circadiano na liberação do hormônio, permitindo a coleta sanguínea em qualquer horário (Costa Filho et al., 2017)

No entanto a técnica tem esbarrado no custo, cerca de 65 reais por exame, variável de acordo com o dólar, o que dificulta seu uso em massa.

O sucesso da estratégia de seleção para precocidade sexual

Em dez anos de seleção para precocidade sexual na mesma fazenda o que a equipe observou foi um aumento significativo da dispersão de frequência dos animais superprecoces e precoces no rebanho. Nesta propriedade iniciamos com 8% dos animais identificados com

precoces ou superprecoces e atualmente atingimos um patamar de 48% dos machos produzidos na fazenda. Olhando o sucesso da seleção pode-se observar no último sumário da Associação Nacional Criadores e Pesquisadores que a genética selecionada no mesmo rebanho predomina hoje nos animais jovens com maior mérito genético, bem como no sumário geral para a raça Nelore nas características ligadas a fertilidade e precocidade, demonstrando que efetivamente o sucesso da seleção para estas características.

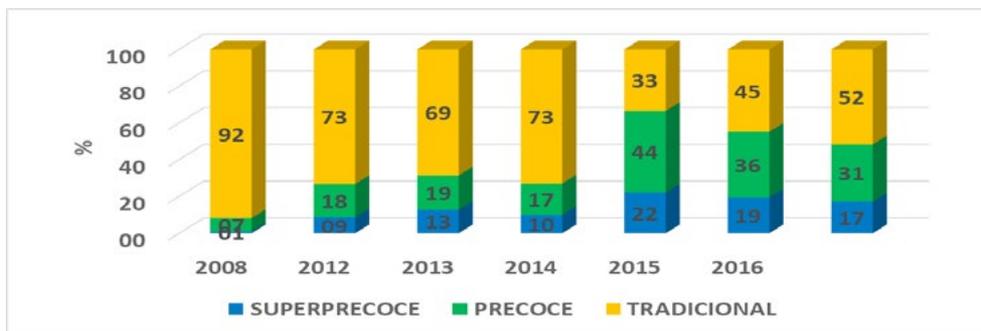


Figura 5. Evolução da seleção de classes de precocidade sexual em uma propriedade de bovinos Nelore machos (n= 4500)



Figura 6. Distribuição de classes de precocidade sexual em três safras (2014, 2015, 2016) de bezerros Nelore (n=3457) de acordo com os pais, considerados apenas aqueles.

Nos 13 rebanhos que trabalhamos já se sobressaem alguns pais que tem apresentado maior percentual de filhos superprecoces/precoces, como pode ser visto na Figura 6. Nossos primeiros estudos de herdabilidade tem mostrado h^2 de 0,40 para precocidade sexual nos machos, mais alta do que a estimada para PE365 ou PE 450 dias para Nelore. Dessa forma em breve em parceria com a ANCP será lançada a DEP IPM (dep para idade a puberdade dos machos) que usará de estratégias de exame clínico andrológico para determinar a idade a puberdade dos machos com maior precisão.

Referências

- BERGMANN, J.A.G. Seleção de Zebuínos para Precocidade Sexual. SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., Viçosa, **Anais...** Viçosa: Ed. Suprema, p. 51-59, 1999.
- BERGMANN, J.A.G.; QUIRINO, C.R.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; PEREIRA, J.C.C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. **Theriogenology**, New York, v. 52, n. 1, p. 25-34, July 1998.
- CARDOSO, D.; NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia da Unopar**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 59-67, jan./jun. 2007.
- COSTA E SILVA, EV; COSTA FILHO, LCC. Precocidade sexual nos machos – Qual a vantagem? **Alta genetics**, I 2017.
- COSTA FILHO, L.C.C.; SOLIGO, E.C.; PEIXOTO, A.S., BARBOSA, F.B.; ROSSIGNOLO, E.A.A.; ASSIS, T.S.; OLIVEIRA, V.M.; SOUZA, M.I.L; COSTA E SILVA, E.V. Avaliação do hormônio Anti-Mülleriano à desmama e precocidade sexual de machos Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL, 2, 2017, Uberlândia, **Anais...** Corumbá: EMBRAPA, 2017, p. 67-70. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164360/1/DOC-146-.pdf>
- GARCIA, J.M.; PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **Ars Veterinária**, [S.l.], v. 3, p. 47-53, 1987.
- GRESSLER, S.L.; BERGMANN, J.A.G., PENNA, V.M.; PEREIRA, C.S.; PEREIRA, J.C.C. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. v. 3, p. 368-370.
- MacNEIL, M.D.; CUNDIFF, L.V.; DINKEL, C.A; KOCH, R.M. Genetic correlations among sex-limited traits in beef cattle. **Journal Animal Science**, [S.l.], v. 58, n. 5, p. 1171-1180, May 1984.
- OKAY, T.S. Hormônio anti-mulleriano: importância na prática pediátrica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 49, n. 1, p.1-23, 2003.
- QUEIROZ, V.L.D. **Hormônio anti-Mulleriano e puberdade em machos Nelore**. 2014. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia, Universidade federal de mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.
- QUIRINO, C.R.; BERGMANN, J.A.G. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in Nelore bulls using ani and bivariate animal models. **Theriogenology**, [S.l.], v. 48, n. 7, p. 1398-1396, 1998.
- REY, R.A.; LORDEREAU-RICHARD, L.; CAREL, J.C.; BARBET, P; CATE, R.L.; ROGER, M.; CHAUSSAIN, J.L.; JOSSO, N. Anti-Müllerian hormone and testosterone serum levels are inversely related during normal and precocious pubertal development. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.**, [S.l.], v. 77, n. 5, p.1220-1226, Nov. 1993.
- SUMÁRIO DE TOUROS – MAIO 2018. Ribeirão Preto: ANCP. 2018. 108p.
- WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on a high nutrition allowance. **Journal Animal Science**, [S.l.], v. 224, n. 3, p.761-765, 1965.

Agradecimentos: À agência financiadora Fundect; à CAPES e Fundect pelas bolsas de mestrado e doutorado; ao CNPq pelas bolsas de IC; à Genética Aditiva pelo apoio no projeto e à Procriar Assistência Veterinária.

Resumos



III Reunião Anual da
ABRAA
Associação Brasileira de Andrologia Animal

As estações do ano influenciam na qualidade do sêmen de touros Nelore

Camila Dutra de Souza¹
camiladutrasouza@hotmail.com

Talita Raquel Cavichioli Sebastião¹

Gabriela Figueredo Cornacini¹

Fernanda Luiza Guinossi Barbosa Deak¹

Marcelo George Mungai Chacur¹
chacur@unoeste.br

Abstract: The objective of the present study was to evaluate the seasonal effect on the seminal parameters of Nelore bulls raised in extensive management in the tropical climate. Twenty-four-month-old Nelore bulls were submitted to semen collection by electro-ejaculation e spermogram, twice per season during the four seasons of the year. The sperm motility was higher ($P < 0.05$) in winter (79%) than in spring (61%) and summer (68%), as well as sperm vigor, which was higher ($P < 0.05$) in winter (3.3) in relation to spring (2.7). In winter, the ambient temperature (22°C) was more pleasant ($P < 0.05$) when compared to spring (29°C) and summer (29°C). Larger sperm defects (DMA) were higher ($P < 0.05$) in the summer (18%) when compared to winter (9%). It is concluded that the quality of the semen was influenced by the seasons. Summer had a negative influence on semen quality with an increase in total sperm defects. Winter positively influenced semen quality with increased sperm motility.

Keywords: seasonality; tropical climate; zebu bull.

Palavras-chave: clima tropical; sazonalidade; touro zebu.

Introdução - Em sistemas extensivos de produção de gado de corte, a estação de monta geralmente ocorre nos meses mais quentes do ano, no qual os touros são submetidos a variações climáticas que interferem na fertilidade. A temperatura dos testículos do touro entre 4 a 5°C abaixo da temperatura retal é essencial para a boa qualidade do sêmen. Efeitos adversos da temperatura testicular elevada são relatados nas características do sêmen, reduzindo a fertilidade nos ruminantes [1, 2].

Estudos sobre os efeitos do estresse térmico no desempenho reprodutivo de touros são conduzidos por simulação do ambiente natural com câmaras bioclimáticas ou por insulação escrotal [3, 4]. No entanto, poucos estudos têm avaliado a qualidade do sêmen do touro Nelore durante as estações do ano em situações de alto estresse térmico devido às dificuldades na realização dos experimentos em ambiente natural. Portanto, esse trabalho justifica-se pela

¹ Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

necessidade de maiores informações referente ao efeito sazonal nos parâmetros quantitativos e qualitativos do sêmen e à seleção de reprodutores Nelore em regiões tropicais.

A hipótese para o desenvolvimento dessa pesquisa é que a qualidade do sêmen seria menor nas estações do ano com maior temperatura ambiente. Logo, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito sazonal sobre os parâmetros seminais de touros Nelore criados em manejo extensivo nos trópicos.

Material e Métodos - Vinte touros da raça Nelore com 24 meses de idade, no início do estudo, foram usados neste experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UNOESTE) sob o protocolo nº 3479. Os animais foram mantidos a pasto sob as mesmas condições ambientais e alimentados com a pastagem natural de *Urochloa decumbens* com suplementação mineral e água à vontade.

O experimento foi conduzido no município de Anaurilândia (MS/Brasil) localizada na latitude 22° 56' 46" S e longitude 53° 06' 36" e altitude de 380m. O clima é classificado com Aw, de acordo com Köppen-Geiger. O sêmen foi colhido com eletroejaculação, sendo duas coletas por touro para as quatro estações do ano, totalizando 160 ejaculados, 40 em cada estação do ano. As duas coletas de sêmen por estação foram realizadas com intervalo de 30 dias entre as mesmas. Os valores de temperatura ambiente (TA) e umidade relativa do ar (UR) foram coletados a cada hora durante a colheita do sêmen, com termômetro de globo (Instrutemp, São Paulo, SP, Brasil).

O exame consiste em exame reprodutivo específico e análise do sêmen. Ao todo, foram obtidos oito ejaculados de cada animal, dois por estação, usando o eletroejaculador Autojac-Neovet (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brasil) na modalidade automática, proporcionando maior bem-estar aos animais durante a colheita do sêmen. Foram avaliados os seguintes parâmetros: turbilhão (TUR), motilidade espermática (M) e vigor (VIG). Para análise morfológica dos espermatozoides, foi realizada diluição do sêmen em formol salino tamponado (1:100), frente à avaliação de 200 células com microscopia óptica de contraste de fase e avaliados defeitos menores (DMe), defeitos maiores (DMa) e defeitos totais (DT), segundo Barth [5].

O efeito sazonal nos parâmetros seminais (TUR, MOT, VIG, DMe, DMa, DT) foi analisado utilizando o *software* estatístico SAS® *version* 9.3 (*Statistical Analysis Software, Cary, NC*). As variáveis foram analisadas pelo modelo misto (procedimento MIXED), considerando os efeitos dos animais como efeitos aleatórios e as médias dos fatores de variação foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. As diferenças são estatisticamente significativas quando o valor “p” do teste estatístico é inferior ao nível de significância de 5%. ($P \leq 0.05$).

Resultados e Discussão - No presente trabalho, observam-se variações significativas na qualidade seminal: motilidade progressiva espermática (MOT) e vigor espermático (VIG); e na morfologia espermática: defeitos maiores (DMa), defeitos menores (DMe) e defeitos totais (DT), quando comparados nas estações do ano (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das características do sêmen de touros Nelore nas estações do ano.

| Características | Primavera | Verão | Outono | Inverno |
|-----------------|-----------|-------------|-------------|-------------|
| MOT | 61.5±16d | 68.9±17.5bc | 76.9±15.7ac | 79±13.9a |
| VIG | 2.7±0.8b | 2.9±0.8ab | 3.27±0.7a | 3.3±0.8a |
| TUR | 1.6±1.2 | 1.9±1.3 | 1.9±1.5 | 1.9±1.6 |
| DMe | 8.8±4.5ab | 5.5±3.9b | 11.4±6.5a | 9.1±7.6a |
| DMa | 6.8±4.9c | 18.3±9a | 14.1±9.9ab | 9.2±10bc |
| DT | 15.6±7.6c | 23.8±10.8ab | 25.5±13.4a | 18.4±13.1bc |

Na linha, médias sem letra minúscula igual, diferem ($P \leq 0.05$); MOT motilidade (%), VIG vigor (1-5), TUR turbilhão (0-5), DMe defeitos menores (%), DMa defeitos maiores (%), DT defeitos totais (%)

A motilidade espermática progressiva (MOT) apresentou maior porcentagem ($P < 0.05$) no inverno (79%) quando comparado a primavera (61%) e verão (68%), bem como o vigor espermático, que foi maior ($P < 0.05$) no inverno (3.3) em relação à primavera (2.7). No inverno, a temperatura ambiente (22°C) foi mais amena ($P < 0.05$) quando comparado à primavera (29°C) e verão (29°C). Esse fato pode ser explicado pois os fatores climáticos podem causar um efeito no balanço térmico, sendo caracterizada uma alteração nos mecanismos de termorregulação envolvendo a dissipação do calor. Dessa forma, diminui a eficiência da regulação e aumentando por sua vez, a temperatura do escroto-testicular que pode afetar a qualidade do sêmen e a fertilidade do touro [6].

Neste contexto, Kastelic et al. [4] estudaram a insulação escrotal e concluíram que uma moderada elevação da temperatura testicular, reduz de forma drástica a produção espermática, a motilidade progressiva e o número de espermatozoides viáveis no ejaculado. e aumenta a porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais.

Os defeitos espermáticos maiores (DMa) se elevaram no verão (18%) quando comparado ao inverno (9%). Os defeitos maiores são aqueles que apresentam maior relevância para a fertilidade do touro. A temperatura ambiente no verão (29°C) foi maior ($P < 0.05$) quando comparado ao inverno (22°C), sendo a estação com a média mais baixa. Dessa forma, a maior temperatura ambiente acarretou uma elevação na temperatura escrotal, a qual resultou no aumento da porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais. Quando ocorre o insulto térmico, os espermatozoides passam a ter um maior desgaste metabólico [7]. Com base na severidade e duração do insulto térmico, em insulação escrotal, ocorre aumento da temperatura testicular e elevação do metabolismo, onde os testículos recebem menos oxigênio, resultando em falha da espermatogênese [8].

A tabela 2 apresenta a variação da temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante as estações do ano. Nesta tabela, observa-se que houve na primavera e verão, a presença de altas temperaturas e altos índices de umidade relativa do ar, caracterizando um período quente e úmido. Já no outono e inverno, temperaturas ambiente menores com baixo índice de umidade relativa do ar, caracterizando um período frio e seco.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão de fatores climáticos nas estações do ano.

| Fatores | Primavera | Verão | Outono | Inverno |
|---------|------------|-----------|-----------|------------|
| TA | 29.7±2.9a | 29.7±3.4a | 23.7±3.9b | 22.1±4.5b |
| UR | 61.7±11.5a | 53.3±4.8a | 54.7±7.7a | 39.4±12.9b |

Na linha, médias sem letra minúscula igual, diferem ($P \leq 0.05$); TA temperatura ambiente (°C), UR umidade relativa do ar (%)

Considerações Finais - Conclui-se que a qualidade do sêmen sofreu influência das estações do ano. O verão influenciou de forma negativa a qualidade do sêmen com aumento dos defeitos espermáticos totais e o inverno influenciou de forma positiva a qualidade do sêmen com aumento da motilidade espermática.

Referências

- [1] BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; BARBOSA, R.T.; KASTELIC, J.P. Testicular thermoregulation in Bos indicus, crossbred and Bos taurus bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. **Theriogenology**, Philadelphia, PA, v.61, n.3, p.511-528, 2004.
- [2] COULTER, G.H.; SERENGER, P.L.; BAILEY, D.R.C. Relationship of scrotal surface temperature measured by infrared thermography to subcutaneous and deep testicular temperature in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v.84, n.2, p.417-423, 1988.
- [3] KASTELIC, J. P.; COOK, R. B.; COULTER, G. H.; WALLINS, T. E. Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. **Animal Reproduction Science**, Philadelphia, PA, v. 41, p.153–159. 1996.
- [4] KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; PIERSON, R.A.; COULTER, G.H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.65, n. 2, p.111-115, 2001.
- [5] BARTH, A. D. Bull breeding soundness evaluation manual. In: 2nd ed. **The Western Canadian Association of Bovine Practitioners**, Saskatoon, 2000. p. 74.
- [6] MARAI, I. F. M.; EL-DARAWANY, A. A.; FADIEL, A.; ABDEL-HAFEZ, M. A. M. Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. **Tropical Subtropical Agroecosystems**, Yucatan, v. 8, p. 209–234. 2008.
- [7] RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L. H.; SUAGEE, J. K. Metabolic priorities during heat stress with an emphasis on skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 91, p. 2492–2503. 2013.
- [8] SETCHELL, B. P. Heat and the testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Oxford, v. 114, p. 179-194, 1998.

Agradecimentos - À Capes, pela bolsa de Doutorado (PROSUP / CAPES) e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica (PIBIC / CNPq).

Avaliação da longevidade espermática em sêmen de búfalos (*Bubalus bubalis*) refrigerado à 5°C

Jaci Almeida

Doutorando¹ (jacialmeida01@yahoo.com.br)

Beatriz Parzewski Neves

Doutoranda¹ (biaparzewski@gmail.com)

Mayara Ferreira Brito

Doutoranda¹ (mayarafebrito@yahoo.com.br)

Verônica Alexandra Becerra Becerra

Mestranda¹ (mvz.veronicabecerra@hotmail.com)

Patrícia Alencar Auler

Doutoranda¹ (patricia_auler@yahoo.com.br)

Marc Henry

Professor¹ (henrym2601@gmail.com)

Abstract: Ejaculates of 11 buffalo bulls (one per bull), Murrah, aged from 5 to 6 years were collected by artificial vagina and submitted to the analysis of the physical and morphological characteristics. The objective of the experiment was to test *in vitro* the efficacy of four different extenders: Control (TRIS with 10% LDL) and the same extender adding 0.5, 1 and 2% soy lecithin (SL) on buffalo sperm longevity. After collection, ejaculates were fractionated in 4 aliquots, and diluted to obtain 50x10⁶ SPTZ/mL. Each sample was filled into 0.5 mL vats, refrigerated for 4 hours, using a cooling curve of 0.25°C/min. The vats were kept refrigerated at 5°C and sequentially evaluated (at 1, 24, 48, 72, 96 and 120 hours of incubation) for sperm motility (total and progressive), using the computerized system (CASA). Sperm membrane integrity was evaluated by the hyposmotic test, at times 1, 24, 48 and 72 hours of incubation. Friedman's test was used for the statistical analysis (P<0.05). Progressive spermatozoa and plasma membrane integrity were higher (P<0.05) in TRIS extender with 10% LDL plus 0.5% SL (67.2 and 67.9%) at 48 hours of registration. In conclusion, a comparative evaluation of sperm parameters obtained *in vitro* revealed that the TRIS extender with 10% LDL plus 0.5% LS was more effective in preserving sperm characteristics for up to 48 hours and therefore is an option to be used for AI and FTAI in buffaloes.

Keywords: sperm kinetics, hyposmotic, Reproduction.

Palavras-chave: cinética espermática, hiposmótico, reprodução.

Introdução - Várias biotécnicas reprodutivas são utilizadas no Brasil, porém, a mais difundida é a inseminação artificial (IA). A IA com sêmen criopreservado é a biotécnica reprodutiva mais acessível e que serve como ferramenta para o melhoramento genético dos rebanhos, inclusive para a espécie *Bubalus bubalis*. No entanto, a IA em bubalinos, que tem como base o uso do sêmen congelado, apresenta alguns gargalos como: dificuldade na detecção de cios, a falta de sêmen no mercado nacional; touros com genética superior, mas que não resistem

¹ Programa de Pós-Graduação em Clínica e Cirurgia Veterinárias Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte, MG

ao processo de congelamento e injúrias causadas aos espermatozoides durante o processo de congelamento, podendo causar um decréscimo de até 60% na viabilidade da população espermática em bubalinos.

Assim a hipótese desse trabalho é que se pode melhorar a capacidade de preservar a integridade dos espermatozoides bubalinos com o decorrer do tempo de refrigeração a 5°C em função do meio diluidor. Face ao exposto, objetiva-se avaliar os efeitos na refrigeração do meio TRIS com 10% de lipoproteína de baixa densidade (LDL), como substituto da gema de ovo, acrescido de diferentes concentrações de lecitina de soja (LS) sobre a qualidade espermática *in vitro* como alternativa para uso em programas de IATF.

Material e Métodos - O estudo foi realizado após aprovação pela Comissão de Ética (EV/UFMG), com a aprovação do nº 368/2015. Foram utilizados 11 búfalos, da raça Murrah, com idade 5 e 6 anos, condicionados a coleta de sêmen com vagina artificial, mantidos a pasto durante todo o experimento, com fornecimento de sal e água *ad libitum*. As coletas de sêmen foram feitas com o auxílio de vagina artificial, com temperatura de 42-45°C, sendo inicialmente induzida uma falsa monta (intuito de aumentar a concentração espermática), e coletado o ejaculado da segunda monta. Após as coletas, todos os ejaculados foram submetidos às análises das características físicas e morfológicas do sêmen (CBRA, 2013).

As LDLs foram obtidas pela técnica descrita Neves *et al.* (2008), utilizando ovos frescos produzidos em granja comercial. O diluidor básico para os grupos de tratamento utilizados neste estudo foi composto por: TRIS (2,42g), ácido cítrico (1,36g), Frutose (1,0g), Amicacina (83,4µg/mL), Equex 0,4%, LDL (10 mL) e H₂O Milli-Q® autoclavada (completar 100 mL) adaptado de Brito (2014), sendo todos os reagentes utilizados da Sigma-Aldrich®.

A LS em pó Solec FP-40® (Solae), foi utilizada nas concentrações 0, 0,5, 1 e 2%, sendo que o processo de homogeneização para a produção do diluidor foi realizado separadamente. Primeiramente homogeneizou-se a LDL por 24 horas em balcão-frigorífico a 5°C. De forma similar foi homogeneizada a LS também por 24 horas. E por fim produziu-se a solução TRIS, a qual foi fracionada em 4 alíquotas, adicionando-se a LDL para cada um dos meios e a LS, obtendo-se as concentrações finais de 10% de LDL para todos os meios e para a LS as concentrações de 0,5, 1 e 2%. Foi utilizada uma concentração final de 50x10⁶ SPTZ/mL, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL para a refrigeração.

As palhetas foram acondicionadas em sacos plásticos submersos em recipiente com água (1,4 L) a 27°C e colocadas dentro de outra cuba com água (14 L) a 5°C que estava em ambiente a 5°C (balcão frigorífico) obtendo-se uma curva de resfriamento de 0,25°C/minuto.

Para a avaliação cinética no CASA, utilizou-se o aparelho (SCA® v.4.0). As avaliações foram feitas nos tempos pós-diluição (1) e pós-refrigeração a 5°C (24, 48, 72, 96 e 120 horas). Gotas de 5 µL de cada amostra foram avaliadas entre lâmina e lamínula, previamente mantidas a 37°C, sendo capturados para cada amostra 5 campos, homogêneos, com um mínimo de 200 células espermáticas em cada um.

Para a avaliação da integridade de membrana espermática (IME) usou-se o HOST. Uma alíquota de 50 µL de sêmen foi adicionada a 500 µL de uma solução hiposmótica contendo frutose-citrato de sódio a 121 mOsm/L (2,702g de frutose + 1,324g de citrato de sódio). Esta solução foi incubada por 30 minutos em banho-seco a 37°C e fixada em 200 µL de formol salina tamponada, para posterior análise em microscópio de contraste de fase (x1000). Duzentas células foram contadas e classificadas de acordo com a presença ou não de cauda enrolada. As análises foram realizadas nos tempos 1, 24, 48 e 72 horas pós diluição e incubação.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o pacote STATA 12.0, e o teste de Friedman na comparação de cada extensor par a par (comparação via “pairwise”).

Resultados e Discussão - Os parâmetros espermáticos encontrados apresentaram-se acima dos valores mínimos recomendados para a espécie bubalina (CBRA, 2013). Este achado demonstra a normalidade da função reprodutiva dos doadores e expressa o resultado do regime de coleta semanal ininterrupta por pelo menos três anos consecutivos.

Os valores de motilidade e dos parâmetros de cinética espermática avaliados pelo sistema computadorizado (CASA) estão apresentados na tabela 1, por horário de avaliação. Na primeira avaliação pós-diluição foram observadas em todos os extensores, uma motilidade espermática progressiva (MP) com valores superiores a 79,0%, não sendo observada qualquer diferença no potencial de preservação das motilidades pelos quatro extensores. Isto foi indicativo que neste tempo e temperatura de incubação, todos os meios não apresentavam qualquer componente ou concentração que fosse deletério a manutenção das motilidades.

Após 24 horas de refrigeração foi possível observar que a MP apresentou diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre o controle e o tratamento contendo 0,5% de LS. Sendo favorável ao diluidor com 0,5% de LS, evidenciando um ganho de movimento espermático quando associado a LS no meio extensor contendo LDL. Nos tempos posteriores de refrigeração, o diluidor TRIS com 0,5% de LS apresentou valores de MP igual ou superior ao meio controle. O diluidor com 0,5% de LS apresentou ainda valores similares ou superiores para os demais parâmetros cinéticos nos demais tempos avaliados (tabela 1).

Pode-se observar que até 48 horas de incubação os valores de MP mantiveram-se acima dos 50% para os meios contendo LS, sendo o melhor resultado encontrado para o meio com 0,5% de LS ($P < 0,05$). Percentuais estes, superiores ao 30% recomendado para espécie pelo CBRA (2013), para sêmen congelado. A manutenção da motilidade nestes valores por este tempo mostra o bom potencial, desta forma de preservação espermática, para uso em IA convencional e IATF.

Já a avaliação da integridade de membrana espermática pelo HOST, evidenciou que os diluidores preservaram a integridade de membrana espermática por até 72 horas. Sendo observada uma queda gradativa desta, assim como dos parâmetros cinéticos com o decorrer do tempo de incubação. Os meios com maiores concentrações de LS, apresentaram menor capacidade cinética e de preservação da integridade de membrana ($P > 0,05$), assim como o meio com 0,5% de LS apresentou os melhores resultados para a maioria dos tempos e parâmetros avaliados, conforme tabela 1 (valores sombreados).

Os resultados indicaram que o sêmen refrigerado a 5°C diluído em TRIS 10% LDL + 0,5% LS, preservou *in vitro*, as características espermáticas e de integridade de membrana após 48 horas, mantendo uma motilidade significativamente alta ($P < 0,05$). Caso estes bons resultados se repitam *in vivo*, refletiria em maiores taxas de prenhes em relação ao sêmen congelado, sendo uma alternativa técnica viável no intuito de aumentar a capacidade de fertilização do sêmen de búfalo a ser utilizado em programas de IA e IATF. Possibilitando desta forma, que fossem realizadas entre duas a três coletas de sêmen semanais, o que permitiria inseminar um grande número de vacas com sêmen de qualidade e usar touros superiores que não resistem ao processo de congelamento seminal.

Conclusões e considerações - Os resultados indicaram que o sêmen refrigerado a 5°C diluído em TRIS 10% LDL + 0,5% LS foi melhor preservado ao longo do período de incubação comparativamente aos demais meios testados. Considerando a qualidade dos espermatozoides refrigerados avaliados *in vitro* por pelo menos até 48 horas de incubação, pode-se inferir caso estes bons resultados se repitam *in vivo*, que o potencial fertilizante do sêmen refrigerado tem todos os requisitos para no mínimo igualar e mesmo ultrapassar a capacidade fertilizante do sêmen congelado. Estas características credenciam o sêmen refrigerado como uma alternativa técnica viável em programas de IA e IATF. A longevidade espermática encontrada no sêmen refrigerado permite idealizar um manejo de duas a três coletas semanais o que permitiria inseminar um grande número de vacas com sêmen de qualidade e usar touros superiores com sêmen que não resista adequadamente ao processo de congelamento.

Referências

- CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte. 2013, 104p.
- NEVES, M.M. **Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino**. 2008. 116f. Tese (Doutorado) - EV/UFMG, Belo Horizonte.

Tabela 1 - Efeitos do extensor TRIS com 10% LDL com diferentes concentrações de lecitina de soja (LS), utilizados para o sêmen de 11 búfalos (1 ejaculado/doador), pós-diluição (T1 horas - temperatura ambiente), e refrigerado à 5°C (T24, T48, T72, 96 e 120 horas) para os parâmetros de cinética e até 72 horas para o Teste Hiposmótico (HOST).

| Parâmetros espermáticos | Tempo (horas) | Extensores | | | |
|-------------------------|---------------|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | | TRIS 10% LDL | TRIS 10% LDL + 0,5% LS | TRIS 10% LDL + 1% LS | TRIS 10% LDL + 2% LS |
| MP (%) | 1 | 80,5 ^a | 79,0 ^a | 83,5 ^a | 80,0 ^a |
| | 24 | 61,4 ^b | 78,3 ^a | 72,7 ^{ab} | 69,1 ^{ab} |
| | 48 | 49,7 ^c | 67,2 ^a | 57,5 ^{bc} | 54,0 ^{bc} |
| | 72 | 39,1 ^d | 44,0 ^b | 46,4 ^a | 40,3 ^a |
| | 96 | 29,2 ^b | 32,8 ^{ab} | 35,6 ^a | 23,3 ^c |
| | 120 | 19,9 ^a | 21,7 ^a | 20,4 ^a | 17,5 ^a |
| VCL (µm/s) | 1 | 111,2 ^a | 96,5 ^{ab} | 86,9 ^{ab} | 84,5 ^a |
| | 24 | 85,3 ^a | 84,6 ^a | 87,1 ^a | 89,0 ^a |
| | 48 | 84,7 ^a | 76,1 ^{ab} | 74,8 ^{ab} | 62,3 ^b |
| | 72 | 66,6 ^a | 59,0 ^{ab} | 57,0 ^b | 63,6 ^a |
| | 96 | 56,9 ^a | 58,7 ^a | 56,6 ^a | 48,5 ^a |
| | 120 | 57,8 ^a | 61,6 ^a | 56,3 ^{ab} | 51,2 ^a |
| VAP (µm/s) | 1 | 68,3 ^a | 61,3 ^a | 58,2 ^{ab} | 48,8 ^b |
| | 24 | 53,8 ^a | 49,5 ^{ab} | 45,3 ^b | 39,0 ^b |
| | 48 | 51,4 ^a | 44,4 ^a | 44,9 ^a | 34,0 ^b |
| | 72 | 51,0 ^a | 42,0 ^b | 33,5 ^c | 32,0 ^c |
| | 96 | 45,3 ^a | 39,8 ^a | 34,7 ^a | 26,9 ^a |
| | 120 | 33,1 ^{ab} | 36,0 ^a | 31,8 ^{bc} | 27,6 ^c |
| VSL (µm/s) | 1 | 46,4 ^a | 44,1 ^{ab} | 44,6 ^{ab} | 32,5 ^a |
| | 24 | 39,9 ^a | 34,0 ^a | 35,8 ^a | 33,7 ^a |
| | 48 | 37,1 ^a | 30,6 ^{ab} | 35,4 ^{ab} | 21,7 ^b |
| | 72 | 39,8 ^a | 35,0 ^a | 25,4 ^b | 22,2 ^b |
| | 96 | 36,6 ^a | 28,1 ^a | 26,7 ^a | 19,5 ^a |
| | 120 | 27,9 ^a | 28,2 ^a | 24,7 ^{ab} | 18,1 ^b |
| LIN (%) | 1 | 36,5 ^a | 40,8 ^{ab} | 39,2 ^{ab} | 45,9 ^a |
| | 24 | 45,3 ^{ab} | 61,2 ^a | 43,2 ^{ab} | 40,4 ^a |
| | 48 | 33,1 ^b | 46,3 ^a | 47,6 ^a | 33,5 ^a |
| | 72 | 37,1 ^b | 44,2 ^a | 40,8 ^{ab} | 38,1 ^{ab} |
| | 96 | 56,9 ^a | 53,3 ^a | 38,8 ^b | 37,5 ^a |
| | 120 | 40,9 ^a | 43,5 ^a | 42,2 ^a | 45,9 ^a |
| STR (%) | 1 | 64,6 ^b | 75,0 ^a | 73,6 ^{ab} | 72,3 ^{ab} |
| | 24 | 72,9 ^b | 85,6 ^a | 76,2 ^b | 75,4 ^a |
| | 48 | 63,6 ^b | 75,4 ^a | 79,8 ^a | 66,2 ^a |
| | 72 | 71,3 ^b | 83,4 ^a | 73,8 ^{ab} | 72,3 ^a |
| | 96 | 83,5 ^a | 77,3 ^{ab} | 76,3 ^b | 74,6 ^a |
| | 120 | 73,4 ^b | 75,3 ^{ab} | 78,4 ^a | 78,2 ^a |
| WOB (%) | 1 | 60,0 ^{ab} | 65,4 ^a | 59,1 ^b | 58,9 ^b |
| | 24 | 63,1 ^b | 76,3 ^a | 56,6 ^b | 54,3 ^c |
| | 48 | 59,1 ^a | 60,5 ^a | 59,9 ^a | 52,8 ^b |
| | 72 | 59,4 ^{ab} | 75,2 ^a | 52,5 ^b | 52,7 ^b |
| | 96 | 70,9 ^a | 63,7 ^a | 53,6 ^b | 54,8 ^b |
| | 120 | 56,6 ^a | 57,7 ^a | 56,2 ^a | 58,7 ^a |
| ALH (µm) | 1 | 5,0 ^a | 3,9 ^a | 4,4 ^a | 3,4 ^a |
| | 24 | 3,9 ^b | 2,1 ^b | 4,0 ^a | 4,4 ^b |
| | 48 | 4,1 ^c | 2,8 ^a | 3,5 ^b | 3,7 ^b |
| | 72 | 4,1 ^b | 2,7 ^a | 3,2 ^b | 3,5 ^b |
| | 96 | 2,6 ^a | 3,5 ^b | 3,7 ^b | 3,7 ^b |
| | 120 | 3,5 ^a | 3,0 ^a | 3,2 ^a | 3,6 ^a |
| BCF (Hz) | 1 | 9,0 ^a | 10,0 ^a | 9,5 ^{ab} | 9,4 ^{ab} |
| | 24 | 9,2 ^a | 11,0 ^a | 9,5 ^b | 9,3 ^b |
| | 48 | 9,6 ^{ab} | 10,8 ^a | 10,6 ^a | 9,2 ^b |
| | 72 | 8,9 ^a | 8,9 ^a | 9,6 ^a | 9,7 ^a |
| | 96 | 10,1 ^a | 9,7 ^a | 9,7 ^a | 9,9 ^a |
| | 120 | 9,5 ^a | 9,0 ^a | 8,0 ^a | 9,6 ^a |
| HOST (%) | 1 | 80,3 ^{ab} | 81,5 ^a | 76,9 ^{ab} | 74,4 ^b |
| | 24 | 73,7 ^{ab} | 74,9 ^a | 68,1 ^{bc} | 60,7 ^c |
| | 48 | 66,6 ^a | 67,9 ^a | 59,4 ^{ab} | 52,1 ^b |
| | 72 | 59,4 ^{ab} | 60,9 ^a | 50,7 ^{ab} | 43,5 ^b |

Letras diferentes em cada característica espermática (linha), diferem estatisticamente entre si (P<0,05). MP: Motilidade Progressiva; VCL: Velocidade Curvilínea; VAP: Velocidade de Trajeto; VSL: Velocidade Progressiva; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; WOB: Índice de Oscilação; ALH: Amplitude do Deslocamento Lateral de Cabeça; BCF; Frequência de Batimentos de Cauda; HOST: Teste Hiposmótico e Valores sombreados são os superiores (linha).

Testicular volume growth curves and sperm traits in the highest and the lowest spectrum of scrotal circumference in Nellore bulls

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹

E-mail: penitentefilho@yahoo.com.br

Edgar Andrés Díaz-Miranda¹

Denise Okano¹

Paula Piccolo Maitan¹

Bruna Waddington¹

Danielle Estanislau Coelho Silva¹

Juliana Nascimento Duarte Rodrigues¹

Faider Alberto Castaño Villadiego¹

José Domingos Guimarães¹

Orientador. E-mail: jdguima.ufv@gmail.com

Abstract: This study aimed to describe longitudinal testicular volume (TV) measurements and evaluate sperm traits of bulls in the highest and the lowest spectrum of scrotal circumference (SC). Classification was made at 18-21 months of age and bulls were classified as: highest, SC>34 cm; and lowest, SC<30 cm. Sperm traits evaluated were: sperm motility, minor defects, major defects and normal sperm. Growth curves were described by Logistic model and sperm traits were analyzed by ANOVA. Estimated TV was higher in highest group along all analyzed period. Inflection points were 507.8 cm³ at 419.6 days for highest group and 470.8 cm³ at 808.4 days for lowest group. At 18-21 months, bulls in highest group presented better sperm parameters (P<0.05). Bulls in lower SC spectrum reached sperm traits similar to bulls in higher spectrum at 37-48 months; however, highest group bulls exhibited higher sexual precocity.

Keywords: nonlinear models, precocity, testicular growth.

Palavras-chave: crescimento testicular, modelos não lineares, precocidade.

Introduction - Selection of bulls based on scrotal circumference (SC) at earlier ages is performed to improve reproductive performance of the herd [1]. In addition, Nellore bulls with larger SC at early ages keep presenting larger SC throughout lifetime [2]. Moreover, SC is strictly related to sexual precocity and it is genetically and phenotypically correlated to age at puberty of males and females [3]. However, sperm production may depend on factors other

¹ Universidade Federal de Viçosa

* Autor para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av Peter Henry Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36571-000.

than SC, such as testicular volume (TV); thus, this trait should be considered in selection of bulls [4, 5].

The heritability of TV in Nellore bulls, at 21 months of age, is 0.33 [3], indicating the possibility of selecting bulls for higher TV values in breeding programs. Moreover, favorable phenotypic correlations were reported between TV and SC [4-6] and sperm traits such as sperm motility [6].

This study aimed to describe longitudinal TV measurements and evaluate sperm traits of Nellore bulls divergently classified according to SC measured at 18-21 months of age, in the lowest and the highest spectrum of SC.

Material and Methods - Data used in this study are from Nellore bulls raised in grazing conditions, born between 1996 and 2008. The animals were located in two farms. The first one is located in Magda/SP (20.6455° South, 50.2314° West), with average annual temperature of 22 °C and annual rainfall of 1200 mm. The second is in Dois Irmãos do Buriti/MS (20.2947° South, 55.4454° West), with annual average temperature of 23.3 °C and annual rainfall of 1400 mm.

On both farms, the calving season occurs from August to November. After birth, calves are kept with their mothers in *Urochloa spp* pasture, with *ad libitum* water and mineral salt. Weaning is performed when calves reach 7-8 months of age. Testicular biometry was obtained annually at the time of the breeding soundness examination, which begins at 18 months of age.

The SC was measured by metric tape in the largest region of the scrotum, considering both testes positioned side by side. Testicular width and length were obtained by pachymeter and the TV was calculated as proposed by Bailey et al. [3].

$$TV = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{L}{2}\right) \left(\frac{W}{2}\right) \left(\frac{W}{2}\right)$$

Where: TV = testicular volume (cm^3); L = testicular length (cm); and W = testicular width (cm).

Volume of both testes was used. Semen was collected by electroejaculation and sperm traits were evaluated. Sperm motility (0-100%) and morphological classification in minor defects, major defects and normal sperm were performed according to CBRA [7]. A total of 443 evaluations from 96 bulls were obtained.

Bulls were classified according to SC, measured at 18-21 months of age, into two groups, representing two extremes of the SC spectrum: *highest*, $SC > 34$ cm (209 evaluations from 46 bulls); and *lowest*, $SC < 30$ cm (234 evaluations from de 50 bulls).

The TV growth curves were described by Logistic model:

$$TV_t = \frac{\beta_1}{1 + \beta_2 e^{(-\beta_3 t)}} + e_i$$

Where: TV_t is the testicular volume at t days; β_1 is the asymptote (value of TV at maturity); β_2 is an integration constant; β_3 is the maturing index; and e_i is the error, assumed $e_i \sim NID(0, \sigma^2)$.

Residual autocorrelation was verified by Durbin-Watson test, when significant ($P < 0.5$), it was modeled with first order autoregressive errors ($AR(1)$) [8].

Inflection point was calculated as $\frac{\beta_1}{2}$. Sperm traits at 18-21 months and at 37-48 months of age were analyzed by analysis of variance.

Results and Discussion - Parameter estimates were: for the *highest* group: $\beta_1 = 1015.53 \pm 25.41$, $\beta_2 = 2.22 \pm 0.38$, and $\beta_3 = 0.0019 \pm 0.00027$; for the *lowest* group: $\beta_1 = 941.51 \pm 23.54$, $\beta_2 = 5.95 \pm 1.15$, $\beta_3 = 0.0022 \pm 0.00025$. Growth curves are showed in Figure 1. Estimated TV was higher for the *highest* group along all analyzed period. The TV growth in both groups reached a plateau at similar ages (around 2500 days). This age seems to be later than the age in which the SC growth reaches a plateau in Nellore bulls [2].

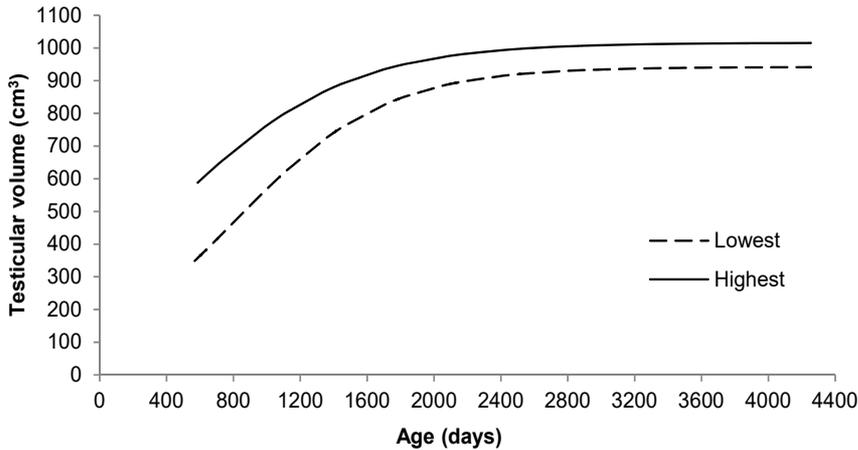


Figure 1. Testicular volume growth curves estimated by logistic model in Nellore bulls divergently classified according to the scrotal circumference, measured at 18-21 months of age

Estimates of inflection points were 507.8 cm^3 at 419.6 days of age for the *highest* group and 470.8 cm^3 at 808.4 days of age for the *lowest* group. The inflection point is the moment at which growth acceleration ends and the self-inhibition phase begins, until reaching the size at maturity [1]. Thus, it is possible to infer that the *highest* group bulls presented higher sexual precocity.

Bulls of the *highest* group presented better sperm parameters ($P < 0.05$) at 18-21 months of age; however, no differences ($P > 0.05$) were observed between groups at 37-48 months (Table 1).

Results suggest that bulls that were classified as *lowest* SC at age of 18-21 months, in their adult life (37-48 months), can reach a similar condition to those bulls considered as *highest* SC. Nevertheless, the ages at inflection points and values of sperm traits at 18-21 months indicate that *highest* group bulls showed higher sexual precocity.

Table 1. Sperm traits (mean \pm SEM) of Nelore bulls at 18-21 months and at 37-48 months of age, according to the classification of the scrotal circumference measured at 18-21 months.

| Group | Motility (%) | Normal sperm (%) | Major defects (%) | Minor defects (%) |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 18-21 months of age | | | | |
| Highest | 70.6 \pm 2.4 ^a | 76.3 \pm 2.8 ^a | 17.3 \pm 2.5 ^b | 6.4 \pm 0.9 ^a |
| Lowest | 58.8 \pm 3.1 ^b | 66.3 \pm 3.2 ^b | 27.9 \pm 3.0 ^a | 5.8 \pm 0.6 ^a |
| 37-48 months of age | | | | |
| Highest | 76.1 \pm 1.5 ^a | 85.3 \pm 1.3 ^a | 9.7 \pm 0.9 ^a | 5.0 \pm 0.7 ^a |
| Lowest | 72.4 \pm 1.8 ^a | 83.7 \pm 2.5 ^a | 11.6 \pm 2.2 ^a | 4.7 \pm 0.6 ^a |

Different letters within a column, for each age-group, differ at $P < 0.05$.

Conclusion - Bulls with high SC values at 18-21 months of age keep high TV values throughout life. In addition, TV growth apparently reaches a plateau later than the SC.

Differences in TV growth and sperm traits between groups evaluated in this study are probably related to sexual precocity.

References

- [1] Loaiza-Echeverri AM, Bergmann JAG, Toral FLB, Osorio JP, Carmo AS, Mendonça LF, Moustacas VS, Henry M. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzarat bulls raised under grazing conditions. *Theriogenology*, 2013;79:751-9.
- [2] Penitente-Filho JM, Villadiego FAC, Silva FF, Camilo BS, León VG, Peixoto T, Díaz E, Okano D, Maitan P, Lima D, Guimarães SF, Siqueira JB, Pinho R, Guimarães JD. Can scrotal circumference-based selection discard bulls with good productive and reproductive potential? *PLoS ONE* 2018;13: e0193103.
- [3] Silveira TS, Siqueira JB, Sarmento LR, Eler JP, Torres RA, Guimarães SEF, Miranda Neto T, Guimarães JD. Estimativas de herdabilidades e correlações genéticas entre características reprodutivas em touros da raça Nelore. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2012;64:1427-35.
- [4] Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. *Theriogenology*, 1998;49:581-94.
- [5] Unanian MM, Silva AEDF, McManus C, Cardoso EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. *Rev Bras Zootec*, 2000;29:136-44.
- [6] Dias JC, Andrade VJ, Martins JAM, Emerick LL, Vale Filho VR. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. *Pesq Agropec Bras*, 2008;43:53-9.
- [7] CBRA (Colégio Brasileiro Reprodução Animal). *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 3th ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- [8] SAS Institute Inc. *SAS/ETS® 13.2 User's Guide*. Cary, NC: SAS Institute Inc. 2014.

Acknowledgements - Authors thank to Agropecuária CFM, CAPES, CNPq and Fapemig.

Uso da equação de Michaelis-Menten na descrição do crescimento da circunferência escrotal em touros Nelore

Paula Piccolo Maitan^{1*}

E-mail: paulamaitan@yahoo.com.br

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹

Denise Silva Okano¹

Edgar Andrés Díaz-Miranda¹

Daniele Estanislau Coelho Silva¹

Bruna Waddington de Freitas¹

José Domingos Guimarães¹

Orientador. E-mail: jdguima.ufv@gmail.com

Abstract: This study aimed evaluate the use of random effects in Michaelis-Menten model (MM) to describe longitudinal scrotal circumference (SC) data in Nelore bulls. Dataset consisted of 3918 SC measurements from 843 bulls. Growth curves were described by the MM equation: (1) considering fixed effects; and (2) mixed model considering fixed and random effects. Goodness of fit was evaluated by: Akaike (AIC), Bayesian (BIC) information criteria and coefficient of determination (R^2). R^2 values were similar between the models, however, model (2) presented considerably lower AIC and BIC values than the model (1), indicating that mixed model fitted better to the observed SC data. The MM was useful in describing the SC growth curve in Nelore bulls, presenting two parameters with biological interpretation: β_1 (asymptote) representing the SC value at maturity; and β_2 , age at which the SC reaches half of the asymptotic value and that may be related to sexual precocity.

Keywords: cattle, non-linear models, testicular growth.

Palavras-chave: bovinos, crescimento testicular, Modelos não lineares.

Introduction: Scrotal circumference (SC) is generally used in animal breeding programs due to its easy measurement and genetic and phenotypic correlations with age and puberty of males and females [1,2].

The description of testicular growth can be performed using non-linear regression models. These models allow synthesizing information from longitudinal data in a few parameters that can be biologically interpretable [3].

Michaelis-Menten equation (MM) was originally used to relate the reaction rate with amount of substrate [4]; its use in animal growth curve already has been related in beef bulls [5,6].

¹ Universidade Federal de Viçosa

* Autor para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36571-000.

In general, random effects of experimental units must be modeled when using repeated measurements derived from the same animal over time. Thus, nonlinear mixed models considering both fixed and random effects are preferred to better describe the observed data with individual repeated measures [7].

This study aimed compare the use of random effects in Michaelis-Menten model in description of SC growth in Nelore bulls.

Material and Methods: The data used in this study are from Nelore bulls raised under grazing conditions, born between 1996 and 2008. Animals were located in two farms. First in Magda/SP (20.6455° South, 50.2314° West), with annual average temperature of 22 °C and annual rainfall of 1200 mm. Second in Dois Irmaos do Buriti/MS (20.2947° South, 55.4454° West), with annual average temperature of 23.3 °C and annual rainfall of 1400 mm.

In both farms calving season occurs in August to November. After birth calves are kept with their mothers in *Urochloa spp* pasture, with water and salt *ad libitum*. Weaning is performed when calves reach age of 7-8 months. Testicular biometry was obtained annually at the time of the andrological exam which begins at age of 18 months. At least four biometric measurements were obtained per animal. Ages at biometric evaluations time ranged from 497 to 4340 days. Total of 3918 scrotal circumference measurements of 843 bulls composed the data set.

To describe growth curve Michaelis-Menten equation was used considering or not the random effects, as follows:

$$(1) SC_t = \frac{\beta_1 t}{t + \beta_2} + e_i \qquad (2) SC_t = \frac{(\beta_1 + u_1)t}{t + (\beta_2 + u_2)} + e_i$$

In which: SC_t = scrotal circumference at t days; β_1 = asymptote, SC value at maturity; β_2 = age in which $SC = \beta_1 / 2$; u_1 = random effect related to asymptote; u_2 = random effect related to β_2 ; e_i = error.

The growth curve parameters (β_1 e β_2) were estimated using NLMIXED procedure of *Statistical Analysis System* (SAS). The individual random effects allowed each bull to have their own subject-specific asymptote and shape centered at β_1 and β_2 . Residual errors were assumed to be independent and identically distributed according to normal distribution with mean zero and variance σ^2 [8]. Convergence criteria were defaults os the SAS for the dual Quasi-Newton algorithm. Genetical relationship between individuals was not considered in the analysis.

Godness of fit of all models was evaluated by: Akaike's information criterion (AIC), Bayesian information criterion (BIC) and coefficient of determination (R^2).

Results and Discussion: The estimated growth curve parameters (β_1 e β_2) are presented in table 1. The estimated SC growth curves by the two models are shown in Figure 1.

In several nonlinear models used to describe SC growth curve, β_2 parameter is an integration constant without biological interpretation; however, in Michaelis-Menten model, these parameters represent the age in days of half final growth [4], thus, β_2 may be considered as an indicative of sexual precocity based on SC [6].

The goodness of fit parameters for the two studied models are represented in Table 1. Values of R^2 were similar between the models, however, model (2), which considers random effects, presented values of AIC and BIC considerably lower than model (1), indicating a better adjustment.

Table 1. Parameters estimates (\pm standard error) and values of AIC, BIC and R^2 obtained by Michaelis-Menten model used to describe SC growth curve in Nelore bulls.

| Model | β_1 | β_2 | R^2 | AIC | BIC |
|-----------|-----------------------|---------------------|--------|-------|-------|
| Model (1) | 43.3358 \pm 0.09659 | 193.98 \pm 3.1656 | 0.5809 | 18105 | 18124 |
| Model (2) | 43.4332 \pm 0.1170 | 194.99 \pm 2.6282 | 0.5809 | 15357 | 15385 |

β_1 = asymptote; β_2 = age in which SC = $\beta_1/2$; AIC = Akaike's information criterion; BIC = Bayesian information criterion; R^2 = coefficient of determination.

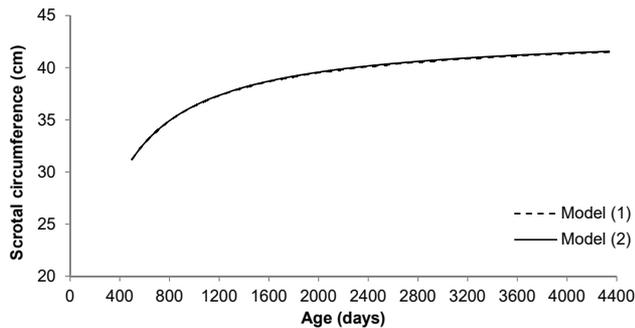


Figure 1. Growth curves of SC obtained by Michaelis-Menten model in Nelore bulls

Final Considerations - Michaelis-Menten model was useful in describing scrotal circumference growth curve in Nelore bulls showing two parameters with biological interpretation: β_1 (asymptote) which represents the SC value at maturity; and β_2 , which can be related to sexual precocity. Lowest values of AIC and BIC found for model (2) indicate that nonlinear model of mixed effects better fitted to observed data of SC in Nellore bulls.

References

- [1] TOELLE, Y.D.; ROBISON, O.W. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. *J. Anim Sci.*, v. 60, p. 89-100, 1985.
- [2] LOAIZA-ECHEVERRI, A.M.; BERGMANN, J.A.G.; TORAL, F.L.B.; OSORIO, J.P.; CARMO, A.S.; MENDONÇA, L.F.; MOUSTACAS, V.S.; HENRY, M. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzerat bulls raised under grazing conditions. *Theriogenology*, v. 79, p. 751-759, 2013.
- [3] FITZHUGH Jr A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. *Journal of Anim Sci.*, v. 33, p. 1036-1051, 1976.
- [4] LÓPEZ, S.; FRANCE, J.; GERRITS, W.J.J.; DHANOA, M.S.; HUMPHRIES, D.J.; DIJKSTRA, J. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *J. Anim Sci.*, v. 78, p. 1816-1828, 2000.

- [5] OLTJEN, J.W.; BYWATER, A.C.; BALDWIN, R.L.; GARRETT, W.N. Development of a dynamic model of beef cattle growth and composition. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 86-97, 1986.
- [6] PENITENTE-FILHO J.M.; VILLADIEGO, F.A.C.; SILVA, F.F.; CAMILO, B.S.; LEÓN, V.G.; PEIXOTO, T.; DÍAZ, E.; OKANO, D.; MAITAN, P.; LIMA, D.; GUIMARÃES, S.F.; SIQUEIRA, J.B.; PINHO, R.; GUIMARÃES, J.D. Can scrotal circumference-based selection discard bulls with good productive and reproductive potential? **PLoS ONE** v. 13, e0193103, 2018.
- [7] KIZILKAYA, K.; BALCIOĞLU, M.S.; YOLCU, H.İ.; KARABAĞ, K.; GENÇ, I.H. Growth curve analysis using nonlinear mixed model in divergently selected Japanese quails. **Arch Geflügelk**, v. 70, p.181-186, 2006.
- [8] LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D.; SCHABENBERGER, O. **SAS® for mixed models**, 2 ed. Cary, NC: SAS Institute Inc; 2006.

Acknowledgment - Agropecuária CFM, CAPES, CNPq e Fapemig.

Residual autocorrelation of the Logistic model in testicular volume growth curve of Nelore bulls

Edgar Andrés Díaz-Miranda^{1*}

E-mail: eddimi07@hotmail.com

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹

Denise Silva Okano¹

Bruna Waddington¹

Paula Piccolo Maitan¹

Danielle Estanislau Coelho Silva¹

José Domingos Guimarães^{1**}

Orientador. jdguima.ufv@gmail.com

Abstract: In this study Durbin-Watson (DW) test was used to evaluate residual autocorrelation of longitudinal testicular volume (TV) measurements of Nelore bulls. Dataset consisted of 2298 TV measurements from 506 bulls. Growth curves were described by Logistic model: (1) we have assumed independence of errors for TV measurements, and (2) we assumed autoregressive first order errors. Goodness of fit was evaluated by: Akaike's (AIC), Bayesian (BIC) information criteria, and adjusted R^2 . Autocorrelation was modeled by determining the growth function parameters by generalized least squares method for nonlinear regression models with first order auto-regressive errors ($AR(1)$). Durbin-Watson statistics showed significant ($P < 0.05$) autocorrelation for model (1) but not for model (2). Model (2) showed higher values of adjusted R^2 (0.67 vs 0.57) and lower values of AIC (29130 vs 29740) and BIC (29147 vs 29757), indicating a better fitting with adding $AR(1)$ to the model.

Keywords: cattle, Durbin-Watson, testicular growth

Palavras-chave: bovinos, crescimento testicular, Durbin-Watson

Introduction - Scrotal circumference (SC) and testicular biometry are simple to obtain and are commonly used to predict fertility in breeding programs of Nelore bulls. However, the SC does not exactly represent the testicular mass that discounts the thickness of the scrotal skin or the testicular form. Thus, measurements of testicular length and width may be a useful tool in predicting fertility of bulls [1].

Sperm production may depend on factors other than SC, such as testicular volume (TV), thus this characteristic should be considered in the selection of bulls [1, 2].

When longitudinal data are being analyzed, the error terms ordered in time are commonly autocorrelated. Therefore, analysis of longitudinal data needs to use methods

¹ Universidade Federal de Viçosa

* Autor para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av Peter Henry Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36571-000.

that can properly accommodate the serial correlation. If such correlation is ignored then inferences can be invalid [3]. In this study, the Durbin-Watson (DW) test was used to evaluate the residual autocorrelation of TV longitudinal measurements of Nellore bulls.

Material and Methods - Data used in this study are from Nellore bulls raised in extensive management, born between 1996 and 2008. The animals were located in two farms. The first one is located in Magda/SP (20.6455° South, 50.2314° West), with average annual temperature of 22 °C and annual rainfall of 1200 mm. The second is in Dois Irmãos do Buriti/MS (20.2947° South, 55.4454° West), with annual average temperature of 23.3 °C and annual rainfall of 1400 mm.

On both farms, the calving season occurs from August to November. After birth, calves are kept with their mothers in *Urochloa spp* pasture, with *ad libitum* water and mineral salt. Weaning is performed when calves reach 7-8 months of age. Testicular biometry was obtained annually at the time of the breeding soundness examination, which begins at 18 months of age. At least four biometric measurements were obtained per animal. The ages at the time of the biometric evaluation ranged from 563 to 4992 days.

The testicular width and length were obtained by pachymeter and the testicular volume was calculated according to the equation proposed by Bailey et al. [1].

$$TV = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{L}{2}\right) \left(\frac{W}{2}\right) \left(\frac{W}{2}\right)$$

Where: TV = testicular volume (cm^3); L = testicular length (cm); and W = testicular width (cm).

Volume of both testes was used in the analyses. A total of 2298 TV measurements from 506 bulls were obtained.

The TV growth curves were described by using Logistic model, as follows:

$$(1) TV_t = \frac{\beta_1}{1 + \beta_2 e^{(-\beta_3 t)}} + e_i$$

$$(2) TV_t = \frac{\beta_1}{1 + \beta_2 e^{(-\beta_3 t)}} + \phi_1 e_{t-1} + e_i$$

Where: TV_t is the testicular volume at t days; β_1 is the asymptote (value of TV at maturity); β_2 is an integration constant; β_3 is the maturing index; e_{t-1} is the residual in day $t-1$; ϕ_1 is first order autoregressive coefficient; and e_i is the error, assumed $e_i \sim NID(0, \sigma^2)$.

Goodness of fit was evaluated by: Akaike's information criterion (AIC), Bayesian information criterion (BIC), and adjusted coefficient of determination (adj R^2).

Durbin-Watson (DW) statistics is given by:

$$DW = \frac{\sum_{t=2}^n (e_t - e_{t-1})^2}{\sum_{t=1}^n e_t^2}$$

Where: e_t is the error associated to time t and e_{t-1} is the error associated to time $t-1$.

Data were analyzed by the MODEL procedure, the residual autocorrelation was modeled by determining growth function parameters by generalized least squares method for nonlinear regression models with first order autoregressive errors ($AR(1)$) [4].

Results and Discussion - Asymptotic value was slightly higher in the model (2). Durbin-Watson test showed significant autocorrelation ($P < 0.05$) for the model (1) but not for the model (2). In addition, model (2) showed higher value of adjusted R^2 and lower values of AIC and BIC (Table 1). The TV growth curves are presented in Figure 1.

Table 1. Parameter estimates (\pm standard error) obtained by the logistic model used to describe the TV growth curve in Nellore bulls

| Model | β_1 | β_2 | β_3 | ϕ_1 | DW | adjR ² | AIC | BIC |
|------------------|-------------------|-----------------|---------------------|-----------------|--------------------|-------------------|-------|-------|
| Model (1) | 991.29 \pm 8.25 | 3.33 \pm 0.20 | 0.002 \pm 0.00008 | - | 1.04* | 0.57 | 29740 | 29757 |
| Model (2) | 994.50 \pm 8.76 | 3.65 \pm 0.20 | 0.002 \pm 0.00008 | 0.48 \pm 0.02 | 2.12 ^{NS} | 0.67 | 29130 | 29147 |

β_1 = asymptote; β_2 = integration constant; β_3 = maturing index; ϕ_1 = first order auto-regressive coefficient; DW = Durbin-Watson test; adj R^2 = adjusted R^2 ; AIC = Akaike's information criterion; BIC = Bayesian information criterion.

Most studies on growth curves of testicular parameters have focused on SC [5], meanwhile the TV growth curve remains overlooked. According to Silveira et al. [6], the heritability of TV in Nellore bulls at 21 months of age is 0.33, indicating the possibility of selecting bulls for high TV values in breeding programs. Moreover, favorable phenotypic correlations have been reported between TV and SC [6, 7] and between TV and sperm traits such as sperm motility [7].

In longitudinal data analyses, time-ordered errors are often autocorrelated. Thus, for this type of data analysis, it is necessary to use methods that can properly accommodate serial correlation. If this correlation is ignored, the inferences may be invalid [3].

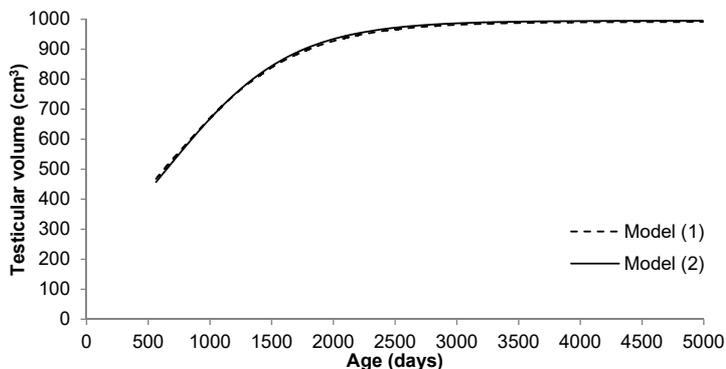


Figure 1. Testicular volume growth curves by Logistic model in Nellore bulls

In the present study, after modeling autocorrelation, the logistic model showed higher adjusted R^2 value and lower AIC and BIC values, such results indicate a better fit when adding first order autoregressive errors ($AR(1)$) to the model.

Conclusion - There are few studies evaluating genetic and phenotypic correlations between TV and reproductive traits, highlighting the need for further studies to describe TV growth in zebu bulls.

The residual autocorrelation and its modeling should be considered in TV longitudinal data analyses in Nelore bulls.

References

- [1] Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology** 1998;49:581-94.
- [2] Unanian MM, Silva AEDF, McManus C, Cardoso EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Rev Bras Zootec** 2000;29:136-44.
- [3] Van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley T. Longitudinal Data Analysis. In: **Biostatistics: A Methodology for the Health Sciences**, 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc; 2004, DOI: 10.1002/0471602396.ch18
- [4] SAS Institute Inc. 2014. SAS/ETS[®] 13.2 User's Guide. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- [5] Siqueira JB, Guimarães JD, Pinho RO. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Rev Bras Reprod Anim** 2013;37:3-13.
- [6] Silveira TS, Siqueira JB, Sarmento LR, Eler JP, Torres RA, Guimarães SEF, Miranda Neto T, Guimarães JD. Estimativas de herdabilidades e correlações genéticas entre características reprodutivas em touros da raça Nelore. **Arq Bras Med Vet Zootec** 2012; 64:1427-35.
- [7] Dias JC, Andrade VJ, Martins JAM, Emerick LL, Vale Filho VR. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesq Agropec Bras** 2008;43:53-9.

Acknowledgements - The authors thank to Agropecuária CFM, CAPES, CNPq and Fapemig.

Mudanças morfológicas do espermatozoide no trato reprodutivo de cães

Teresinha Inês de Assumpção¹

Gustavo Guerino Macedo¹

Laryssa Lays Araujo de Oliveira²

teassumpcao@ufu.br

Abstract: The objective of the study was to characterize the morphological aspects of spermatozoa from the testicles, head, and tail of the epididymis and vas deferens. The samples were collected from ten animals after orchietomy. The testicles received a cross section cut in the middle third and washed with PBS solution, the same with the head and tail of the epididymis and the vas deferens after slicing. The spermatid morphology was evaluated using phase contrast optical microscopy. The supravital test was performed with eosin-nigrosin. The proportion of spermatozoa with abnormalities was considered high (above 44%). The supravital test showed growth of living cells along the reproductive tract, with 33% in the testis and 79% in the vas deferens. The techniques used were efficient to obtain epididymal spermatozoa in dogs and it was evident that the epididymis selected and removed dead and defective cells during sperm maturation.

Keywords: canid, reproduction, sperm maturation.

Palavras-chave: canídeo, maturação espermática, reprodução.

Introdução - Os espermatozoides, após sua formação no testículo, necessitam passar por um processo de maturação no epidídimo para que ele seja capaz de fertilizar o oócito. A maturação espermática ocorre na cabeça e corpo do epidídimo, envolve a aquisição da capacidade fertilizante, modificações bioquímicas da membrana plasmática, motilidade progressiva, migração da gota citoplasmática e remoção de espermatozoides com anormalidades [1; 2; 3].

O espermatozoide é rotineiramente coletado no sêmen ejaculado para análises e processamentos de criopreservação, porém, se um doador acidentalmente morrer ou sofrer lesão física não reprodutiva, o espermatozoide ainda pode ser coletado da cauda do epidídimo [4]. A recuperação de espermatozoides do epidídimo é uma técnica extremamente interessante para obter material genético, pois estes gametas são capazes de resistir a diferentes técnicas de criopreservação, podendo ser utilizados na inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões, entre outras, além de ser uma boa fonte de material para estudos morfológicos [5; 4]. Além disso, o estudo das mudanças ocorridas no espermatozoide durante o trajeto pelo epidídimo dando-lhes a competência de fecundar o oócito permite a melhoria de biotécnicas

¹ Laboratório de Reprodução Animal

² Discente do Curso de Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

reprodutivas [2]. Assim, para se estabelecer técnicas eficientes de reprodução assistida nos cães é necessário antes conhecer a produção e maturação espermática e as características morfológicas dos espermatozoides nas diversas porções do trato reprodutivo.

O objetivo desse estudo foi caracterizar os aspectos morfológicos dos espermatozoides obtidos dos testículos, cabeça e cauda do epidídimo e ducto deferente em cães.

Material e Métodos - Foram utilizados dez animais machos adultos da espécie canina, sem raça e idade definidas, provenientes do projeto de controle populacional de cães pelo método de esterilização cirúrgica desenvolvido nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Após a orquiectomia dos animais, os testículos foram levados ao laboratório em banho de gelo e foram lavados com soro fisiológico para remover qualquer resíduo de sangue. Os testículos dos animais foram retirados junto com os ductos deferentes, dissecados e separados em porções: testículos, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente. Os testículos receberam um corte transversal no terço médio e foram lavados internamente com solução de PBS. 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, sendo utilizados 1,5 ml de solução de PBS em cada porção. Os líquidos resultantes das lavagens foram recolhidos e identificados em tubos de 5 ml e acrescidos de 1 ml de formol salina em cada frasco para preservação das células.

A avaliação morfológica do sêmen foi realizada utilizando o método de preparação em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase, verificando a porcentagem de alterações dos espermatozoides em sua cabeça, peça intermediária e cauda [6]. Foi contado um total de 200 células de cada porção do trato reprodutivo avaliada.

O teste supravital foi feito utilizando eosina-nigrosina, preparada com eosina Y (3,3g), nigrosina (20g), citrato de sódio (1,5g) e água destilada (300 ml) [6]. Para a preparação da lâmina, o corante e o sêmen foram aquecidos a temperatura ambiente, colocado uma gota de sêmen e uma de corante, feito o esfregaço, e posterior avaliação após secagem, em microscopia óptica. A avaliação foi feita em 200 células, verificando a porcentagem de vivos (células não coradas) e mortos (células coradas).

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 depois de várias horas da morte do animal [3; 5; 4]. A técnica de fatiamento epididimário foi semelhante à realizada por Varesi et al.[3] e Hori et al. [4] em cães que, como nesta pesquisa, também obtiveram boa quantidade de células espermáticas.

A tabela 1 mostra as porcentagens de alterações morfológicas verificadas nas quatro porções do trato reprodutivo analisadas.

Tabela 1. Alterações morfológicas dos espermatozoides de cães verificadas no testículo, cabeça do epidídimo, cauda do epidídimo e ducto deferente (porcentagem).

| Tipo de alteração | Testículo | Cabeça Epid. | Cauda Epid. | 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 |

A porcentagem média de anormalidades nos espermatozoides epididimários dos cães foi de 47%, 65%, 57% e 44%, no testículo, na cabeça do epidídimo, na cauda do epidídimo e no ducto deferente, respectivamente. Semelhante a este estudo, Varesi et al.[3] também verificaram alta quantidade de espermatozoides com alterações morfológicas no epidídimo de cães, em torno de 75% na cabeça, 61% no corpo e 49,5% na cauda. Observamos uma predominância de gota citoplasmática proximal (GCP) (29%) no testículo e de distal (GCD) na cauda de epidídimo (14%) como também verificado por Varesi et al. [3], com baixa incidência de anormalidades da cabeça do espermatozoide sendo 5% no testículo reduzindo durante a passagem no trato genital. Podemos notar também uma alta incidência de cabeças isoladas principalmente na cabeça do epidídimo e de defeitos de cauda nas porções epididimárias e ducto deferente, o que pode ser explicado devido a motilidade adquirida pela cauda durante a maturação do espermatozoide na cabeça do epidídimo. As alterações morfológicas de maior incidência foram GCP, GCD, cabeça isolada normal e cauda fortemente dobrada ou enrolada. Houve uma variação entre a quantidade e qualidade dos defeitos das células espermáticas no testículo, nas porções do epidídimo e ducto deferente, com alternância entre as quantidades das mesmas. Observou-se uma redução das GCP de 29% no testículo para 2% no ducto deferente mostrando assim a maturação das células na sua passagem pelo epidídimo, como também foi observado por Gatti et al. [7].

Há poucos relatos na literatura sobre morfologia de espermatozoides ao longo do trato reprodutivo. Hori et al. [4] observou uma média de anormalidades muito baixa (média de 7,6%) na cauda do epidídimo em cães da raça Beagle de 1,7 anos de idade (média). Já Varesi et al.[3] verificaram uma alta quantidade de células anormais no epidídimo como verificado neste estudo em cães sem raça e idade definidas, com uma baixa quantidade de células normais na cabeça, corpo e cauda do epidídimo, sendo $24,7 \pm 11,9$, $39,0 \pm 13,8$ e $50,5 \pm 13,3\%$, respectivamente.

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 e tinham raça e idade desconhecidas, pois o material do estudo foi proveniente de orquiectomias em um projeto de controle populacional de cães, semelhante aos utilizados no estudo de Varesi et al.[3].

O teste supravital evidenciou o aumento de células vivas ao longo do trato reprodutivo com 33% no testículo, 77% na cabeça do epidídimo, 80% na cauda do epidídimo e 79% no ducto deferente. O número de espermatozoides mortos foi muito alto no testículo (67%) e foi reduzindo a quantidade ao passar pelo epidídimo chegando a 21% apenas no ducto deferente, o que mostra a seleção celular que o epidídimo faz com os espermatozoides durante a sua maturação, pois segundo Varesi et al. [3] durante o trajeto dos espermatozoides até a cauda do epidídimo há uma remoção de células espermáticas defeituosas, melhorando a qualidade do sêmen.

Conclusões - Os espermatozoides dos cães apresentaram uma alternância nos tipos de anormalidades espermáticas ao longo do trato reprodutivo, mostrando a maturação e seleção celular. Ocorre ainda a retirada de células mortas em suas diversas porções, o que ficou demonstrado no teste supravital.

Os resultados podem contribuir para o domínio da técnica de recuperação celular e estudo das características das células espermáticas de cães que são de suma importância para aplicação das técnicas de reprodução assistida.

Referências Bibliográficas

- [1] OLIVA SU, RINALDO PA, STUMPP T. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v.33, n.4, p.419-425, 2009.
- [2] ANGRIMANI DSR, LÚCIO CF, VEIGA GAL, REGAZZI FM, SILVA LCG, NICHI M, VANNUCCHI CI. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.4, p.323-327, 2013.
- [3] VARESI S, VERNOCCHI V, FAUSTINI M, LUVONI GC. Morphological and acrossomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.55, n.1, p.17, 2013.
- [4] HORI T, ATAGO T, KOBAYASHI M, KAWAKAMI E. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. **Journal Veterinary Medical Science**, v.77, n.5, p.625-630, 2015.
- [5] MOTA FILHO AC, SILVA LDM. Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. **Acta Veterinária Brasileira**, v.6, n.1, p.1-8, 2012.
- [6] CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 2013,104 p.
- [7] GATTI JL, CASTELLA S, DACHEUX F, ECROYD H, MÉTAYER S, THIMON V, DACHEUX JL. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 321-339, 2004.

Diluentes para o resfriamento de sêmen em jacarés tinga (*Caiman crocodilus*)

Teresinha Inês de Assumpção¹

André Luiz Quagliatto Santos¹

Adrielly Julien Silva Lopes²

teassumpcao@ufu.br

Abstract: The objective was to evaluate the efficiency of two types of diluents and two cryoprotectants in the cooling of alligator semen (*Caiman crocodilus*). Five alligators were collected by electroejaculation, semen analyzed physically and morphologically, and diluted in two diluents based on TRIS / glucose / citric acid, with (diluent 2) or without (diluent 1) egg yolk, and 5% of cryoprotectant glycerol or DMSO. Semen was cooled at 5°C for 30 minutes. Motility in fresh semen was 90% and vigor 3. After dilution in diluent 1 that was reduced to 70% and 10%, and with diluent 2 to 70% and 20%, respectively, for glycerol and DMSO. After cooling, the motility with glycerol was of 40% in diluent 1 and 20% with 2. With DMSO the motility was zero. Glycerol showed better protection of the caiman spermatozoa, but the biochemical characteristics of those cells in the species are still unknown.

Keywords: sperm cryopreservation; reproduction; reptile.

Palavras-chave: criopreservação de espermatozoides, reprodução; réptil.

Introdução - O Brasil tem uma grande responsabilidade em relação à preservação de répteis, pois possui a segunda maior riqueza de espécies do mundo. Entre os répteis encontramos seis espécies de jacarés, sendo uma delas o jacaré tinga (*Caiman crocodilus*) [1].

A criação de jacaré em cativeiro (*farming* ou *ranching*) é importante para a preservação da espécie, porém um dos maiores obstáculos é o desconhecimento de informações básicas sobre sua biologia reprodutiva. A reprodução assistida em répteis é uma forma de tentar um êxito maior na conservação e produção comercial das espécies, porém é pouco explorada com reduzidas informações sobre técnicas de coleta, avaliação seminal e preservação de sêmen [2]. A criopreservação de sêmen é fundamental para formar um banco genético de jacarés e armazená-lo por tempo prolongado para ser utilizado na inseminação artificial. É importante determinar protocolos e diluentes adequados às características próprias da espécie para a preservação do sêmen [3].

Nos aligátors, já foram testados alguns diluentes para sêmen. Bons resultados de motilidade foram obtidos por Larsen et al. [4] ao utilizarem gema de ovo e leite para *Alligator mississippiensis*, enquanto que Larsen et al. [5] utilizaram com sucesso BEST (2-hidroxime-

¹ Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres

² Discente de Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

til- 2-ácido aminoetano sulfônico) e gema de ovo para resfriar sêmen de *Caiman latirostris*. Em *Crocodylus porosus*, Johnston et al. [6] utilizaram diluentes a base de TRIS (hidroximetil aminometano) e BEST na preservação do sêmen e Johnston et al. [7] obteve sucesso no congelamento do sêmen da mesma espécie utilizando um diluente composto por PBS (tampão fosfato-salino), sacarose e glicerol.

Os crioprotetores são essenciais no diluente de sêmen para manter a integridade celular, apesar de seu conhecido efeito tóxico a célula. O glicerol mostrou-se muito tóxico as células de aligátor com 100% mortalidade [4] manteve a motilidade por 24 horas na concentração de 2% [5], enquanto que Johnston et al. [6;7] obteve sucesso na criopreservação do sêmen de crocodilos de água salgada utilizando 0,68 M de glicerol. Já o DMSO (dimetilsulfóxido) mostra uma boa proteção às células mantendo motilidade em 37,5% até 48 horas [4], enquanto que Johnston et al. [6] tiveram bom resultado de motilidade ($47,0 \pm 6,6\%$) com DMSO a 0,68M e resultados ruins em concentrações mais elevadas.

Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência de dois tipos de diluentes e dois crioprotetores no resfriamento do sêmen de jacarés tinga (*Caiman crocodilus*).

Material e Métodos - Foi coletado o sêmen de cinco jacarés tinga (*Caiman crocodilus*) de vida livre, na Fazenda Boa Esperança, município de Araguaiana, MT (licença nº 45947-2/ICMBIO). O estudo foi autorizado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia, protocolo nº 112/2014.

As coletas de sêmen foram realizadas pelo método por eletroejaculação. Todas as coletas foram realizadas sem sedação do animal, apenas com contenção física. Utilizou-se um eletroejaculador portátil (Autojac - Neovet[®] - Brasil), acoplado a uma sonda (18 x 2 cm) com os 3 eletrodos. A sonda foi introduzida na cloaca do animal após exposição do falo. O protocolo de coleta foi de acordo com o descrito por Assumpção et al. [2].

O volume do sêmen foi avaliado utilizando uma pipeta volumétrica. Os testes de motilidade e vigor foram feitos com o auxílio de microscópio óptico, utilizando uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, analisando a motilidade progressiva das células e a intensidade do movimento (vigor - 0 a 5). A concentração de células/mL foi avaliada com o auxílio da câmara de Neubauer e a avaliação morfológica do sêmen foi realizada utilizando o método de preparação em câmara úmida sob microscopia óptica de contraste de fase, verificando a porcentagem de anormalidades dos espermatozoides [8].

Após a verificação do volume do sêmen e das concentrações totais das amostras, estas foram diluídas em meio a base de TRIS: Diluente 1) 3,6 grs de TRIS; 2,0 grs de ácido cítrico; 0,10 grs de glucose; 0,02 mg amicacina (100 mL) e Diluente 2) 3 grs de TRIS; 1,7 grs de ácido cítrico; 1,25 grs de frutose; 20% de gema de ovo; 0,02 mg amicacina (100 mL). O sêmen foi diluído na proporção de 1 sêmen: 3 diluente. As amostras diluídas foram divididas em 2 porções (com duplicatas), sendo que cada uma recebeu 5% de crioprotetor glicerol ou DMSO. Após a diluição os frascos foram resfriados em geladeira a 5°C por 30 minutos. Avaliou-se a eficiência do diluidor e do crioprotetor analisando a motilidade e o vigor após a diluição e após o resfriamento.

Os dados obtidos tiveram suas médias comparadas pelo teste T de Student e considerado como diferença significativa entre as variáveis testadas o $p < 0,01$.

Resultados e Discussão - O sêmen recém-coletado dos jacarés mostrou uma excelente média de motilidade (90%) e vigor (3). A concentração foi bastante elevada com média de 2 bilhões/ml e a porcentagem de células com morfologia normal foi 85% (média). Após a diluição nos meios 1 e 2 com glicerol tivemos uma redução da motilidade para 70% (tabela 1), mas o vigor se manteve. Já na diluição com DMSO a redução de motilidade foi alta em ambos os diluentes.

Houve uma diferença significativa nas médias de motilidade e vigor entre os diluentes pré e pós-resfriamento, exceto para os D1 e D2 com glicerol no sêmen fresco, o mesmo observado entre os crioprotetores glicerol e DMSO no sêmen fresco e resfriado.

Os resultados de motilidade e vigor obtidos no sêmen fresco e após o resfriamento com diluentes 1 (D1) e 2 (D2) acrescidos de glicerol (Gli) ou DMSO encontram na tabela 1.

Tabela 1. Médias de motilidade e vigor do sêmen de jacaré tinga (*Caiman crocodilus*) após diluição com os diluentes a base de TRIS (D1 e D2) no sêmen fresco e pós resfriamento ($p < 0,01$).

| | Sêmen fresco | | | | Sêmen resfriado | | | |
|-------------------|--------------|-----------|----------|-----------|-----------------|-----------|----------|-----------|
| | D1 + Gli | D1 + DMSO | D2 + Gli | D2 + DMSO | D1 + Gli | D1 + DMSO | D2 + Gli | D2 + DMSO |
| Motilidade | 70 | 10 | 70 | 20 | 40 | 0 | 20 | 0 |
| Vigor | 3 | 1 | 3 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 |

Os diluentes utilizados foram a base de TRIS que foi escolhido por sua ação como tampão iônico bipolar e sua capacidade de reduzir o metabolismo pela célula espermática. Segundo Johnston et al. [5] apesar da capacidade de tamponamento e osmolaridade semelhante a do espermatozoide o TRIS não é capaz de manter a motilidade, mas é capaz de manter a membrana plasmática intacta. A adição de gema de ovo no diluente 2 não trouxe um resultado positivo na motilidade, contrariando o relatado por Larsen et al. [4] que testando diversos diluentes a base de TRIS e BEST verificaram que a sobrevivência dos espermatozoides após refrigeração a 5°C foi maior nos meios que continham 20% de gema de ovo. Também Johnston et al. [6] observaram que a gema de ovo no meio diluidor manteve a motilidade em $47,8 \pm 8,3\%$ por 24 horas a 4°C, mas afirmam que os espermatozoides são tolerantes a rápidas mudanças de temperatura (sem choque térmico) sem a necessidade de gema de ovo para proteção da membrana plasmática, além de que esta pode interferir no equilíbrio osmótico da célula.

O resultado com os crioprotetores deste estudo é contrário aos de Larsen et al. [4] que observaram que o uso de crioprotetor glicerol na concentração 5 e 10% resultaram em baixa ou nenhuma motilidade, já com DMSO a motilidade foi mantida em 37,5% até 48 horas após sua diluição a 5 °C em *Alligator mississippiensis*. Já os resultados de Larsen et al. [5] foram semelhantes aos deste estudo, com bons resultados em *Caiman latirostris* quando utilizaram

concentração de 2% de glicerol com motilidade de 75% logo após a diluição. Já Johnston et al. (6; 7) obtiveram bons resultados com DMSO a 0,68 M e grande queda de motilidade quando utilizaram o glicerol. Johnston et al. [6] observaram que espermatozoides de crocodilos resfriados a 4°C são sensíveis as concentrações crescentes de crioprotetor DMSO e glicerol, mas apesar do aparente efeito citotóxico do glicerol aos espermatozoides ele é importante para manter integridade da membrana plasmática e do DNA celular.

Considerações Finais - A reprodução de jacarés, natural ou assistida, ainda representa um grande desafio, pois ainda há pouca quantidade de informações sobre a fisiologia reprodutiva da espécie. É vital o conhecimento dos mecanismos celulares e bioquímicos destas células para se estabelecer métodos eficientes de avaliação da qualidade espermática, seleção de diluentes e protocolos para o resfriamento e congelamento do sêmen para serem utilizados em reprodução assistida.

Referências Bibliográficas

- [1] ICMBio. 2018. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. **Fauna Brasileira**. Disponível em: www.icmbio.gov.br. Acessado em 25 de março 2018.
- [2] ASSUMPÇÃO TI, SANTOS ALQ, CANELO EA. Semen collection techniques for Spectacled Caimans *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758). **Herpetology Notes**, v.10, p.697-701, 2017a.
- [3] SOUZA ALP, LIMA GL, SILVA AR. Alternativas para o aperfeiçoamento dos protocolos de criopreservação de sêmen de animais selvagens. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.2, p.98-102, 2014.
- [4] LARSEN RE, CARDEILHAC PT, LANE TJ. Semen extenders for artificial insemination in the American alligator. **Aquaculture**, v.42, n.2, p.141-149, 1984.
- [5] LARSEN RE, VERDADE LM, MEYRELLES CF, LAVORENTI A. Broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*) semen collection, evaluation, and maintenance in diluents. In: **11° Working Meeting of the Crocodile Specialist Group**, 1992, Gland, Switzerland. Anais...Gland: IUCN - The World Conservation Union, 1992, p. 270-276.
- [6] JOHNSTON S, LEVER J, MCLEOD R, QUALISCHEFSKI E, BRABAZON SW, COLLINS S. Extension, osmotic tolerance and cryopreservation of saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) spermatozoa. **Aquaculture**, n. 422-423, p. 213-221, 2014.
- [7] JOHNSTON S, QUALISCHEFSKI E, COOPER J, MCLEOD R, LEVER J, NIXON B, ANDERSON AL, HOBBS R, GOSÁLVEZ J, LÓPEZ-FERNÁNDEZ C, KEELEY T. Cryopreservation of saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*) spermatozoa. **Reproduction Fertility Development**, v.29, n.11, p.2235-2244, 2017.
- [8] ASSUMPÇÃO TI, SANTOS ALQ, SANTOS RB, MACEDO GG. Assisted reproduction in alligators: physical and morphological characterization of spectacled caiman semen *Caiman crocodilus* Linnaeus, 1758. **International Journal of Current Science and Technology**, v.5, n.10, p.513-516, 2017b.

Semen collection by urethral catheterization in giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*): an alternative to electro-ejaculation

Lilja Fromme¹

Postgraduate student, e-mail: lilja_fromme@web.de

Teresinha Inês Assumpção²

André Luiz Quagliatto Santos²

Evandro Canelo³

Flávia Regina Miranda⁴

Gediendson Ribeiro Araújo⁵

Ralph Brehm¹

Ursula Siebert¹

Abstract: Giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) are threatened of extinction and the future use of assisted reproductive techniques might contribute to the conservation of this species. In order to establish an alternative to electroejaculation, semen collection by urethral catheterization after immobilization with medetomidine and ketamine was tested in two adult giant anteaters. Semen samples of both animals were of whitish colour and presented a mean volume of $165 \pm 15 \mu\text{l}$, mean sperm motility of $45 \pm 5 \%$, mean concentration of $4,6 \pm 12 \times 10^8 / \text{ml}$ and mean sperm morphological defects of $55,25 \pm 27,25 \%$. The described semen collection method could serve as a simple and inexpensive alternative to electroejaculation in giant anteaters and is easy to apply in routine health assessment and under field conditions.

Keywords: reproduction, sperm, Xenarthra.

Palavras-chave: reprodução, espermatozoide, Xenarthra.

Introduction - The giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*), due to habitat loss, is categorized as vulnerable by the International Union for the Conservation of Nature [1]. Therefore, the assessment of male reproductive health in captive populations, as well as the implementation of assisted reproductive techniques, such as semen banking and artificial insemination, are critical for the conservation of this species. The only method described for semen collection in giant anteaters, so far, is electroejaculation [2,3,4]. However, this

¹ Tierärztliche Hochschule Hannover, NI, Germany.

² Laboratório de Ensino e Pesquisa em Animais Silvestres - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

³ Veterinarian, Zoológico Municipal de Uberlândia, MG, Brazil

⁴ Coordenator of the Instituto de Pesquisa e Conservação de Tamanduás no Brasil, Curitiba, PR

⁵ Postdoctoral researcher, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS

procedure involves the risk of urine contamination of the semen sample by stimulation of the bladder and requires expensive equipment and special training [5]. These are limiting factors for its use in routine health assessment in zoological gardens or under field conditions. An alternative protocol for semen collection by urethral catheterization after medetomidine administration has been established in domestic cats [6]. Medetomidine, an alpha-2 agonist, induces smooth muscle contraction in the vas deferens [7], resulting in the release of semen into the urethra, which then can be collected by capillary forces into a urinary catheter. This technique has been tested successfully in various wild animal species, such as the african lion [5] or the jaguar [8]. In both cases a combination of Medetomidine with Ketamine has been used for general anesthesia. This combination is also recommended for immobilization in the giant anteater [9,10]. The present study evaluates the feasibility of semen collection by urethral catheterization after medetomidine administration in giant anteaters in order to establish a simple and economical sperm collection method in this species.

Material and Methods - Semen was collected from two adult captive-born giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) from the zoological garden of Uberlândia (Minas Gerais, Brazil). The two males were 8 and 11 years of age and weighed 37 and 33 kg, respectively. The animals were anaesthetized with an intramuscular injection of Medetomidine (0,08 mg/kg body weight) combined with Ketamine (5 mg/kg body weight). At about 15 minutes post-injection, a sterile dog urinary catheter nº 8 FR (2,7 mm in diameter) was advanced approximately 9 cm into the urethra, just to the height where the prostate gland is expected to be. After 10 minutes the catheter was slowly removed and its contents were ejected into a pre-warmed sterile tube. The volume of the semen sample was measured using a micro pipette. For analyses of sperm motility, a drop of fresh semen was placed on a glass slide, covered with a cover slip and evaluated with light microscopy. Semen concentration was determined in a Neubauer chamber and sperm morphology was assessed, analysing a semen sample fixed in formal saline by phase contrast microscopy [11].

Results and Discussion - The results of the semen analyses are shown in table 1.

Table 1. Results of analyses of semen collected by urethral catheterization in two adult giant anteaters.

| Parameters | Mean values |
|-----------------------|--------------------------------|
| Volume | 165 ± 15 µl |
| Sperm motility | 45 ± 5 % |
| Concentration | 4,6 ± 12 × 10 ⁸ /ml |
| Morphological defects | 55,25 ± 27,25 % |

Semen samples presented a lower volume, but higher sperm concentration than the samples obtained by electro-ejaculation in previous works [2,3]. This might be contributed to the fact that during electro-ejaculation the accessory sex glands are stimulated to excessive

secretion. Values for sperm motility and total sperm defects were similar to findings in semen analyses in other captive giant anteaters [2]. However, sperm motility was lower and number of sperm defects were higher than observed in free-ranging giant anteaters [3]. The lower semen quality of giant anteaters held in captivity is possibly a result of inadequate nutrition, stress and other environmental factors.

Conclusions - This study demonstrates that urethral catheterization after medetomidine administration is an effective method for semen collection in giant anteaters. The described method could serve as a simple, inexpensive alternative to electro-ejaculation and thus facilitate andrological examination in giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*) and advance research on assisted reproductive measures.

References

- [1] IUCN 2018. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2018-1. Downloaded on 20 February 2018. <http://www.iucnredlist.org>.
- [2] Mendonça MAC. (2010) **Análise descritiva do perfil espermático do Tamanduá-bandeira** (*Myrmecophaga tridactyla*, Linnaeus 1758) de cativo. Master's Dissertation. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, Downloaded on 09 August 2015. <http://www.teses.usp.br>
- [3] Luba CN, Boakari YL, Lopes AMC, da Silva Gomes M, Miranda FR, Papa FO, Ferreira JCP. Semen characteristics and refrigeration in free-ranging giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Theriogenology**. v.84, p.1572-1580, 2015.
- [4] Tsuneda PP, Junior MFD, Senra LE, Jorge AA, Hatamoto-Zervoudakis LK, Paz RCR da. Análise seminal e padronização da coloração eosina-nigrosina em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.22(3-4), p.198-201, 2015.
- [5] Lueders I, Luther I, Scheepers G, Horst G. Improved semen collection method for wild felids: urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). **Theriogenology**. v.78(3), p.696-701, 2012.
- [6] Zambelli D, Cunto M, Prati F, Merlo B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. **Theriogenology**. v.68(5), p.796-803, 2007.
- [7] Baumgarten HG, Falck B, Holstein AF, Owman C, Owman T. Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorimetric study. **Cell and Tissue Research**. v.90(1), p.81-95. 1968.
- [8] Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, Costa DS, Braud C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. **Animal Reproduction Science**. (in press)
- [9] West G, Carter TS, Shaw J. Edentates (Xenarthra). In: **Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia**. Oxford, Blackwell Publishing. 1. ed, p.349-353, 2007.
- [10] Miranda FR. **Manutenção de Tamanduás em Cativeiro**. São Carlos, Editora Cubo. 1.ed., p.162-164, 2012.
- [11] CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 3. ed., p.104, 2013.

Acknowledgements - The authors thank the Zoological Garden of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil for the help and assistance with this study.

Avaliação dos parâmetros Doppler velocimétricos, qualidade espermática e níveis séricos de testosterona em cães férteis

Marcelo Carvalho dos Santos¹

Barbara Contiero²

Stefano Romagoli³

Isabel Candia Nunes da Cunha⁴

cunhaicn@gmail.com

Abstract: This study aimed to examine the dopplervelocimetric pattern of the testicular arteries of 8 dogs of different sizes at three different sites during 4 consecutive months. The testicular volume, peak systolic velocity (PSV), end diastolic velocity (EDV), resistance index (RI), pulsatility index (PI) were performed. A significant difference in PSV was found between the arteries of each testicle ($p < 0.001$). The IP of marginal artery was influenced by the animal weight ($p = 0.043$) and the IR by the time of day and by the animal weight ($p = 0.043$, $p < 0.001$, respectively). A significant effect ($p = 0.023$) was observed between the animal weight and the number of spermatozoa produced. No statistical difference was observed in the seminal parameters, testicular volume, animal weight and serum testosterone levels. Doppler ultrasound for characterization of the testicular artery in dogs of different sizes and velocimetric Doppler values can vary between both testicles.

Keywords: canine reproduction, semen, ultrasound.

Palavras-chave: reprodução canina, sêmen, ultrassom.

Introdução - A ultrassonografia bidimensional associada ao Doppler colorido e pulsado (o triplex Doppler) fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos sanguíneos, permitindo determinar a presença, a direção e o tipo de fluxo sanguíneo [1]. A ultrassonografia Doppler é uma ferramenta importante na avaliação andrológica em seres humanos; no entanto, este método não é tão amplamente usado pelos andrologistas caninos. Mais recentemente, o uso do Color Doppler permitiu obter informações a respeito do fluxo e velocidades sanguíneas em testículos [2,3]. O objetivo deste estudo foi caracterizar a normalidade do fluxo sanguíneo dos testículos de cães e medir a velocidade de pico sistólico (PVS), velocidade diastólica final (VDF), índice de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP) das artérias testiculares mensalmente durante um período de 4 meses e avaliar se houve alguma mudança ao longo do tempo, associando o peso animal, qualidade espermática, níveis séricos de testosterona e o horário da realização do exame ultrassonográfico.

¹ Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UENF

² Servizio Statistico, MAPS - Università degli Studi di Padova, Italia

³ Professor, Animal Reproduction, Department of Animal Medicine, Production and Health, University of Padova, Italy

⁴ Professora do LRMGA da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil.

Material e Métodos - Foram utilizados oito cães de diferentes raças pesando entre 10 a 36 Kg com idades variando de 2 a 11 anos e com histórico de fertilidade comprovada. Os animais foram avaliados uma vez ao mês por 4 meses consecutivos (M1, M2, M3, M4) com 30 dias de intervalo. Para a avaliação da qualidade espermática foram considerados os seguintes parâmetros: volume espermático (ml), motilidade (MOT) (%), vigor (0-5), relação de vivos e mortos (%) pelo teste supravital (coloração eosina/nigrosina), a integridade da membrana citoplasmática dos espermatozoides (%) pelo teste hipoosmótico (HOST). Foi utilizada a câmara de Burker para determinar a concentração espermática, expressa em SPTZ x 10⁶ml x volume espermático. Foram avaliados 200 espermatozoides em câmara úmida com a coloração Rosa Bengala, determinando-se o percentual de espermatozoides normais (SPTZ normais) e defeituosos (SPTZ DEF). Para a dosagem de testosterona (T), se utilizou o método de quimioluminescência (Immulite® 1000, Medical System, Genova, Italy). A avaliação ultrassonográfica (Philips Affiniti 50, Philips S.p A. Milano, Italy) Color Doppler foi realizada com uma probe linear de 5-18 MHz nas artérias suprategesticulares (AST), artérias intrategesticulares (AIT) e artéria marginal (AM) de ambos os testículos. Três ondas de um ciclo cardíaco foram usadas para medir os valores médios de velocidade de pico sistólico (VPS) e velocidade diastólica final (VDF), que foram usados pelo software da máquina para calcular o índice de resistividade (IR) e o índice de pulsatilidade (IP). Para a determinação do volume testicular foi usada a formula elipsoide: comprimento (C) x altura (A) x largura (L) x 0,5236, usando o mediastino testicular como referência [4]. As avaliações ultrassonográficas foram realizadas de manhã (M) e a tarde (T) de modo aleatório. A análise estatística foi conduzida (SAS 9.4 version - SAS Institute Inc., Cary, NC) utilizando modelo ANOVA onde o tempo foi efeito fixo e cada animal foi considerado um efeito repetido. O nível de significância de P<0.05 foi utilizado em todos os casos.

Resultados e Discussão - Nenhuma diferença estatística foi observada nos parâmetros seminais, volume testicular, peso dos animais e níveis séricos de testosterona entre os horários da manhã (8:00-12:00) e da tarde (14:00-18:00) durante os 4 meses do estudo (p>0.05). Foi observado efeito significativo (p=0.023) entre o peso animal e o número total de espermatozoides produzidos (SPTZ x 10⁶ml x volume), para cada Kg de peso do animal, a concentração espermática aumentou em 18.35 x 10⁶ml, quanto maior o animal, maior o volume testicular, maior a quantidade de parênquima e conseqüentemente maior a produção espermática [4]. Foi encontrada diferença significativa do VPS entre as três artérias de cada testículo (p<0.001) (tabela 1). O parâmetro VDF não variou estatisticamente entre as 3 artérias no testículo esquerdo (p<0.001), porém foi similar entre a AST e AM do testículo direito (p<0.001). No testículo esquerdo não houve diferença significativa do IR nas 3 artérias, todavia no testículo direito só a AIT se diferenciou das demais (p<0.001). Não houve diferença significativa do IP entre as artérias do testículo esquerdo, entretanto no testículo direito o valor encontrado na AST foi diferente significativamente das outras duas (p<0.001). Quando os testículos são comparados entre si, somente o VPS e IP da AST diferiram (p<0.05).

Tabela 1. Parâmetros Doppler velocimétricos (Média ± desvio padrão) das artérias testiculares dos testículos esquerdo e direito de 8 cães avaliados em 4 meses. (n=96).

| Parâmetros | Testículo esquerdo | | | | Testículo direito | | | |
|------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------|
| | AST | AIT | AM | P valor | AST | AIT | AM | P valor |
| VPS (cm/s) | 16.75±4.22 ^a | 5.66±1.69 ^c | 11.08±2.71 ^b | <0.001 | 17.79±4.87 ^a | 6.17±1.93 ^c | 11.97±2.84 ^b | <0.001 |
| VDF (cm/s) | 7.04±2.28 ^{aA} | 2.85±1.0 ^b | 5.99±2.49 ^a | <0.001 | 6.07±1.94 ^{aB} | 3.49±1.22 ^b | 6.41±1.91 ^a | <0.001 |
| IR | 0.55±0.12 | 0.50±0.09 | 0.46±0.13 | 0.068 | 0.62±0.11 ^a | 0.43±0.11 ^b | 0.46±0.14 ^b | <0.001 |
| IP | 0.91±0.29 ^B | 0.84±0.23 | 0.75±0.26 | 0.186 | 1.15±0.36 ^{aA} | 0.66±0.20 ^b | 0.72±0.29 ^b | <0.001 |

VPS= velocidade de pico sistólico; VDF= velocidade diastólica final; IR= índice de resistividade; IP= índice de pulsatilidade. AST=artéria suprategicular; AIT= artéria intrategicular; AM= artéria marginal. Diferentes letras minúsculas na mesma linha, representam diferença significativa entre as artérias de um mesmo testículo. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha, representam diferença significativa entre as artérias e entre os testículos (p<0.05).

Alguns parâmetros dopplervelocimetricos sofreram influência do peso do animal, horário da avaliação ao longo dos 4 meses de observação (Tabela 3). Não foi encontrado efeito das variáveis peso animal, horário (manhã e tarde) e tempo de avaliação (4 meses) com os índices dopplervelocimétricos da artéria suprategicular de ambos testículos, presumivelmente porque esta região é otimamente suprida de sangue independentemente dessas variáveis. Algumas variáveis foram influenciadas pelo horário da avaliação (manhã e tarde). O IR da artéria marginal do testículo esquerdo foi de 0.42±0.01 pela manhã e 0.64±0.04 a tarde (p=0.034). Já o IP da artéria marginal do testículo direito variou de 0.66±0.11 pela manhã e 0.99±0.13 a tarde (p=0.043). Presume-se que estas variações se devam ao horário condicionado que os animais são alimentados, apesar de que todos os animais foram avaliados em jejum. No estudo de Miyazaki et al. (2002) foi observado que o ciclo circadiano em cães varia pouco em 24 horas devido aos ciclos de vigília-sono serem curtos, e os parâmetros de pressão arterial e frequência cardíaca são maiores próximo ao período da alimentação. Foi constatado que o IR e IP da artéria marginal do testículo esquerdo variaram em relação ao peso dos animais (p=0.0003; p=0.043, respectivamente), ou seja, para cada Kg de peso a mais dos animais, o IR e IP diminuíam em 0,01. A mesma observação também foi verificada com o parâmetro VDF da artéria marginal do testículo direito, cada Kg de peso a mais, esta variável aumentou de 0.13 (p=0.009). As variações desses parâmetros podem ser devido a uma necessidade de maior aporte sanguíneo ao testículo esquerdo que são ligeiramente maiores que o direito, além do fato de cães maiores apresentarem volume testicular maior (SOUZA et al., 2014b).

Considerações Finais - O uso da ultrassonografia com Doppler para caracterizar as artérias testiculares é factível e pode ser aplicada na avaliação de testículos caninos, porém deve ser realizada preferencialmente no mesmo horário. Mais estudos são necessários para se obter valores referenciais nos diversos tamanhos existentes na espécie canina.

Tabela 2. Parâmetros Doppler velocimétricos (Média ± desvio padrão) das artérias testiculares dos testículos esquerdo e direito de 8 cães avaliados ao longo de 4 meses (M1, M2, M3, M4) nos horários manhã (M) e tarde (T) (n=96).

| Parâmetro | AST do testículo direito | | | | AIT do testículo direito | | | | AM do testículo direito | | | |
|------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M1 | M2 | M3 | M4 | M1 | M2 | M3 | M4 |
| VPS (cm/s) | 16.64 ±2.69 | 18.53 ±2.87 | 19.20 ±2.70 | 17.95 ±2.64 | 5.30 ±0.92 | 6.90 ±1.15 | 6.16 ±0.93 | 7.40 ±0.90 | 9.38 ±1.26 ^b | 12.40 ±1.43 ^{ab} | 13.23 ±1.28 ^{ab} | 13.35 ±1.21 ^a |
| VDF (cm/s) | 6.05 ±1.02 | 6.18 ±1.15 | 5.96 ±1.03 | 5.14 ±0.99 | 2.70 ±0.55 | 3.26 ±0.72 | 3.56 ±0.56 | 4.69 ±0.52 | 4.26 ±0.78 ^b | 5.48 ±0.91 ^{ab} | 5.95 ±0.80 ^{ab} | 7.45 ±0.75 ^a |
| IR | 0.55 ±0.05 | 0.59 ±0.06 | 0.67 ±0.05 | 0.62 ±0.05 | 0.46 ±0.04 ^{ab} | 0.53 ±0.05 ^a | 0.40 ±0.04 ^{ab} | 0.35 ±0.04 ^b | 0.49 ±0.06 | 0.556 ±0.06 | 0.54 ±0.06 | 0.45 ±0.06 |
| IP | 0.89 ±0.17 | 0.99 ±0.20 | 1.40 ±0.18 | 1.15 ±0.17 | 0.71 ±0.88 ^{ab} | 0.92 ±0.12 ^a | 0.66 ±0.09 ^{ab} | 0.53 ±0.08 ^b | 0.84 ±0.13 | 0.89 ±0.14 | 0.90 ±0.13 | 0.68 ±0.13 |
| Parâmetro | AST do testículo esquerdo | | | | AIT do testículo esquerdo | | | | AM do testículo esquerdo | | | |
| | M1 | M2 | M3 | M4 | M1 | M2 | M3 | M4 | M1 | M2 | M3 | M4 |
| VPS (cm/s) | 17.08 ±2.09 | 19.76 ±2.38 | 17.76 ±2.12 | 16.64 ±2.01 | 6.01 ±0.87 | 9.13 ±0.85 | 6.34 ±0.90 | 5.39 ±0.87 | 8.63 ±1.60 | 13.03 ±1.95 | 11.24 ±1.62 | 9.90 ±1.60 |
| VDF (cm/s) | 7.92 ±1.30 | 8.40 ±1.49 | 7.23 ±1.31 | 6.47 ±1.24 | 2.64 ±0.54 | 3.90 ±0.67 | 2.70 ±0.58 | 2.62 ±0.54 | 3.80 ±1.05 | 7.66 ±1.05 | 5.09 ±1.07 | 5.65 ±1.05 |
| IR | 0.56 ±0.5 | 0.64 ±0.06 | 0.62 ±0.05 | 0.56 ±0.05 | 0.53 ±0.04 | 0.51 ±0.05 | 0.53 ±0.04 | 0.47 ±0.04 | 0.56 ±0.05 | 0.50 ±0.06 | 0.60 ±0.05 | 0.46 ±0.05 |
| IP | 0.93 ±0.14 | 1.13 ±0.16 | 1.06 ±0.14 | 0.98 ±0.14 | 0.94 ±0.11 | 0.90 ±0.11 | 0.97 ±0.12 | 0.80 ±0.11 | 0.91 ±0.11 | 0.92 ±0.13 | 1.03 ±0.12 | 0.67 ±0.11 |

VPS= velocidade de pico sistólico; VDF= velocidade diastólica final; IR= índice de resistividade; IP= índice de pulsatilidade; M= meses. AST=artéria supratesticular; AIT= artéria intratesticular; AM= artéria marginal. Diferentes letras na mesma linha significam diferença estatística (p<0.05).

Referências Bibliográficas

- [1] Nelson, T.R.; Pretorius, D.H. The Doppler signal: where does it come from and what does it mean? *AJR Am J Roentgenol.* v.151, p.439-47, 1988.
- [2] Carrillo, J. D.; Soler, M.; Lucas, X.; Agut, A. Colour and pulsed Doppler ultrasonographic study of the canine testis. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 655-659, 2012.
- [3] Souza, M. B., Barbosa, C. C., Pereira, B. S., Monteiro, C. L. B., Pinto, J. N., Linhares, J. C. S., Silva, L. D. M. Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 96, p. 533-536, 2014a
- [4] Souza M.B., Mota Filho A.C., Sousa C.V.S., Monteiro C.L.B., Carvalho G.G., Pinto, J.N., Linhares J.C.S., Silva L.D.M. Triplex Doppler evaluation of the testes in dogs of different sizes. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.34, n.11, p.1135-1140, 2014b.

Agradecimentos - CAPES/PDSE.

Cluster analysis of nonlinear models used to describe testicular volume growth curve in Nellore bulls

Danielle Estanislau Coelho Silva¹

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹

Denise Silva Okano¹

Autor para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa,
Av Peter Henry Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36571-000.

Edgar Andrés Díaz¹

Paula Piccolo Maitan¹

Bruna Waddington¹

José Domingos Guimarães¹

Orientador: jdguima.ufv@gmail.com

Abstract: This study aimed to use cluster analysis to classify nonlinear models used to describe testicular volume (TV) growth curve in Nellore bulls. Data of 2298 measurements from 506 bulls were used. Ten models were evaluated: Brody, Gompertz, Hill, Logistic I, Logistic II, Meloun, Michaelis-Menten, Mitscherlich, Tanaka and von Bertalanffy. Goodness of fit was evaluated by: Akaike's (AIC) and Bayesian (BIC) information criteria, adjusted R², error sum of squares, mean absolute deviation, Durbin-Watson test and percentage of convergence (C%). Cluster analysis was performed considering the centroid method. Goodness of fit parameters were similar among models; however, Logistic I presented higher C(%). Models were classified into three clusters: Cluster 1: Brody, Gompertz, Hill, Logistic I, Logistic II, Meloun, Mitscherlich and von Bertalanffy; Cluster 2: Tanaka; and Cluster 3: Michaelis-Menten. Cluster 1 presented better fitting values and the models may be equivalent to describe TV growth curve in Nellore bulls, especially Logistic I model.

Keywords: cattle, clustering, testicular growth.

Palavras-chave: análise de agrupamento, bovinos, crescimento testicular.

Introduction - Scrotal circumference (SC) and testicular biometry are simple to obtain and commonly used to predict fertility in breeding programs of Nellore bulls. However, SC does not exactly represent the testicular mass that discounts the variation in scrotal skin thickness or testicular shape. Thus, measurements of testicular length and width may be useful in predicting bull fertility [1]. Sperm production may depend on factors other than SC, such as testicular volume (TV), thus this trait should be considered in bull selection [1, 2].

Description of testicular growth can be performed by fitting nonlinear regression models. These models allow synthesizing information from longitudinal data in some parameters that

¹ Universidade Federal de Viçosa

can be biologically interpreted [3]. Several nonlinear models, such as Brody, von Bertalanffy, Logistic, Gompertz and Tanaka, have already been used to describe testicular growth curves; however, other models such as Meloun, Mitscherlich, Michaelis-Menten and Hill remain overlooked. In addition, most studies are focused on SC rather than TV.

An interesting proposal in studies of growth curves is the use of multivariate classification methods, such as cluster analysis, which allows the formation of homogeneous groups according to the simultaneous evaluation of several characteristics of interest. The usefulness of this methodology is the possibility of classifying models whose results of the evaluators are concordant within a population [4].

Therefore, this study aimed to use cluster analysis to classify nonlinear regression models, used to describe longitudinal data of TV in Nellore bulls.

Material and Methods - Data used in this study are from Nellore bulls raised in extensive management, born between 1996 and 2008. The animals were located in two farms. The first is located in Magda/SP (20.6455° South, 50.2314° West), with average annual temperature of 22 °C and annual rainfall of 1200 mm. The second is in Dois Irmãos do Buriti/MS (20.2947° South, 55.4454° West), with annual average temperature of 23.3 °C and annual rainfall of 1400 mm.

On both farms, calving season occurs from August to November. After birth, calves are kept with their mothers in *Urochloa spp* pasture, with *ad libitum* water and mineral salt. Weaning is performed when calves reach 7-8 months of age. Testicular biometry was obtained annually at the time of the breeding soundness exam, starting at 18 months of age. At least four measurements were obtained per animal. The ages at the time of the evaluation ranged from 563 to 4992 days.

Testicular width and length were obtained by pachymeter and the testicular volume was calculated according to the equation proposed by Bailey et al. [1]:

$$TV = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{L}{2}\right) \left(\frac{W}{2}\right) \left(\frac{W}{2}\right)$$

Where: TV = testicular volume (cm^3); L = testicular length (cm); and W = testicular width (cm).

Volume of both testes was used in the analyses. A total of 2298 TV measurements from 506 bulls were obtained. Growth curves were described by 10 nonlinear models: Brody, $TV_t = \beta_1(1 - \beta_2 e^{(-\beta_3 t)}) + e_i$; Gompertz, $TV_t = \beta_1 e^{(-\beta_2 e^{(-\beta_3 t)})} + e_i$; Hill, $TV_t = \frac{\beta_1 t^{\beta_3}}{\beta_2 \beta_3 + t^{\beta_3}} + e_i$; Logistic I, $TV_t = \frac{\beta_1}{1 + \beta_2 e^{(-\beta_3 t)}} + e_i$; Logistic II, $TV_t = \frac{\beta_1}{1 + e^{(\beta_2 - \beta_3 t)}} + e_i$; Meloun, $TV_t = \beta_1 - \beta_2 e^{(-\beta_3 t)} + e_i$; Michaelis-Menten, $TV_t = \frac{\beta_1 t}{t + \beta_2} + e_i$; Mitscherlich, $TV_t = \beta_1(1 - e^{(\beta_3 \beta_2 - \beta_3 t)}) + e_i$; Tanaka, $TV_t = (1/\sqrt{\beta_2}) \ln \left(\frac{2\beta_2(t - \beta_4) + 2\sqrt{\beta_2^2(t - \beta_4)^2 + \beta_1\beta_2}}{2\beta_2(t - \beta_4) - 2\sqrt{\beta_2^2(t - \beta_4)^2 + \beta_1\beta_2}} \right) + \beta_3$; and Von Bertalanffy, $TV_t = \beta_1(1 - \beta_2 e^{(-\beta_3 t)})^3 + e_i$. Where: TV_t = testicular volume at t days; β_1 = asymptote, TV at maturity; β_2 = integration constant, for Michaelis-Menten model β_2 is the age in which $TV = \beta_1/2$; β_3 = maturing index; β_4 = inflection point.

Parameter estimates were obtained by using the MODEL procedure [5]. Goodness of fit was evaluated by: Akaike's information criterion (AIC); Bayesian information criterion (BIC); adjusted R²; error sum of squares (ESS); mean absolute deviation (MAD); Durbin-Watson test (DW), which was used to verify residual autocorrelation; percentage of convergence (C(%)), which refers to animals in which convergence has been observed in up to 1000 iterations.

After obtaining the goodness of fit parameters for each model, a new dataset was created, in which models corresponded to the experimental units and parameters to the variables. Cluster analysis was then performed in the CLUSTER procedure [5]. The RMSSTD (Root Mean Square Standard Deviation) values allowed identifying the ideal number of clusters [6].

Results and Discussion - The Durbin-Watson test showed significant autocorrelation (P<0.05) for all models, so it was necessary to model the residual serial correlation. Goodness of fit parameters are shown in Table 1.

Table 1. Goodness of fit, after modeling residual autocorrelation, of nonlinear models used to describe the testicular volume growth curve in Nellore bulls

| Model | AIC | BIC | Adj R ² | DW | ESS | MAD | C (%) |
|------------------|-------|-------|--------------------|----------------------|----------|--------|-------|
| Brody | 29144 | 29161 | 0.6713 | 2.1140 ^{ns} | 24350.08 | 123.38 | 59.88 |
| Gompertz | 29136 | 29153 | 0.6725 | 2.1147 ^{ns} | 24374.35 | 123.44 | 65.02 |
| Hill | 29156 | 29173 | 0.6696 | 2.1118 ^{ns} | 24375.74 | 123.44 | 52.37 |
| Logistic I | 29130 | 29147 | 0.6733 | 2.1147 ^{ns} | 24417.54 | 123.54 | 70.55 |
| Logistic II | 29130 | 29147 | 0.6733 | 2.1145 ^{ns} | 24417.62 | 123.54 | 65.42 |
| Meloun | 29144 | 29161 | 0.6713 | 2.1139 ^{ns} | 24349.74 | 123.38 | 58.70 |
| Michaelis-Menten | 29242 | 29253 | 0.6567 | 2.1049 ^{ns} | 25048.31 | 125.99 | 60.47 |
| Mitscherlich | 29144 | 29161 | 0.6713 | 2.1138 ^{ns} | 24350.09 | 123.38 | 58.70 |
| Tanaka | 29166 | 29189 | 0.6682 | 2.1075 ^{ns} | 24619.71 | 124.35 | 26.09 |
| von Bertalanffy | 29138 | 29155 | 0.6722 | 2.1152 ^{ns} | 24363.89 | 123.41 | 63.04 |

^{ns} = not significant (P>0.05); AIC = Akaike's information criterion; BIC = Bayesian information criterion; Adj R² = adjusted R²; DW = Durbin-Watson test; ESS = error sum of squares; MAD = mean absolute deviation; C(%) = percentage of convergence.

The RMSSTD index indicated the ideal number of clusters between two and three. We then chose to group the 10 models into three groups: Cluster 1: Brody, Gompertz, Hill, Logistic I, Logistic II, Meloun, Mitscherlich and von Bertalanffy; Cluster 2: Tanaka; and Cluster 3: Michaelis-Menten. Goodness of fit parameters for all clusters are shown in Table 2.

Table 2. Goodness of fit of the clusters formed from the cluster analysis of nonlinear models used to describe TV growth curve in Nellore bulls

| Parameter | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|
| AIC | 29140 | 29166 | 29242 |
| BIC | 29157 | 29189 | 29253 |
| Adj R ² | 0.6719 | 0.6682 | 0.6567 |
| ESS | 24374.88 | 24619.71 | 25048.31 |
| MAD | 123.44 | 124.35 | 125.99 |
| C(%) | 61.71 | 26.09 | 60.47 |

Cluster 1: Brody, Gompertz, Hill, Logistic I, Logistic II, Meloun, Mitscherlich and von Bertalanffy; Cluster 2: Tanaka; Cluster 3: Michaelis-Menten; AIC = Akaike's information criterion; BIC = Bayesian information criterion; Adj R² = adjusted R²; ESS = error sum of squares; MAD = mean absolute deviation; C(%) = percentage of convergence.

Cluster 1 presented the best goodness of fit values and the models may be equivalent to describe the TV growth curve in Nellore bulls, but the Logistic I model presented higher C(%); this parameter indicates the number of animals to be used in a breeding program. In addition, logistic model has been used to describe the growth of testicular traits such as SC in zebu bulls [7, 8].

Conclusion - Cluster analysis showed to be a useful tool to group nonlinear models according to their fitting parameters.

The models grouped in Cluster 1 were equivalent in the description of the TV growth, especially Logistic I model.

References

- [1] Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology** 1998;49:581-94.
- [2] Unanian MM, Silva AEDF, McManus C, Cardoso EP. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Rev Bras Zootec** 2000;29:136-44.
- [3] Fitzhugh Jr A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. **J Anim Sci**, 1976;33:1036-51.
- [4] Silveira F, Silva FF, Carneiro PLS, Malhado CHM. Classificação multivariada de modelos de crescimento para grupos genéticos de ovinos de corte. **Rev Bras Saúde Prod Anim**, 2012;13:62-73.
- [5] SAS. **SAS/STAT user's guide statistics**. Cary, NC: SAS Inst., Inc.; 2002.
- [6] Cecon PR, Silva FF, Ferreira A, Ferrão RG, Carneiro APS, Detmann E, Faria PN, Morais TSS. Análise de medidas repetidas na avaliação de clones de café 'Conilon'. **Pesq Agropec Bras**, 2008;43:1171-6.
- [7] Quirino CR, Bergmann JAG, Vale Filho VR, Andrade VJ, Pereira JCC. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nellore bulls. **Theriogenology**, 1999;52:25-34.
- [8] Loaiza-Echeverri AM, Bergmann JAG, Toral FLB, Osorio JP, Carmo AS, Mendonça LF, Moustacas VS, Henry M. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzarat bulls raised under grazing conditions. **Theriogenology**, 2013;79:751-9.

Acknowledgments - Authors thank to Agropecuária CFM, CAPES, CNPq and Fapemig.

Fitting nonlinear models to describe scrotal circumference growth in Montana Tropical composite bulls

Denise Silva Okano¹

Autor para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av Peter Henry Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36571-000. E-mail: deniseokano@gmail.com

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹

Edgar Andrés Díaz¹

Paula Piccolo Maitan¹

Bruna Waddington¹

Danielle Estanislau Coelho Silva¹

José Domingos Guimarães¹

Orientador: jdguima.ufv@gmail.com

Abstract: This study aimed to evaluate three non-linear models (Brody, Logistic and Michaelis-Menten) to describe longitudinal data of scrotal circumference (SC) in Tropical Montana composite bulls. A total of 777 SC measurements from 269 bulls composed the dataset. The ages at the time of measurement ranged from 597 to 4019 days. Goodness of fit was evaluated by criteria: Akaike's information criterion (AIC), Bayesian information criterion (BIC) and adjusted R^2 (adj R^2). Michaelis-Menten model presented the highest asymptotic value (β_1) among models, Logistic and Brody models presented similar values of asymptote and maturing index (β_2). Michaelis-Menten model showed the highest value of adj R^2 and the lowest values of AIC and BIC, indicating a better fitting. Further investigations are still needed to describe SC growth in Montana bulls.

Keywords: cattle, nonlinear models, testicular growth.

Palavras-chave: bovinos, crescimento testicular, modelos não lineares.

Introduction - Montana (Montana Tropical composite) is a composite breed, that is, it is obtained by crossbreeding between bulls and cows of different breeds (taurine and zebu) to explore not only the additive genetic values but also heterosis and the complementarity between breeds, in order to obtain the highest level of heterosis in the progeny, an average of 86 to 89% [1].

The scrotal circumference (SC) is commonly used in breeding programs due to its easy measurement and genetic and phenotypic correlations with age at puberty of males and females [2, 3]. In addition, the SC shows favorable genetic correlations with reproductive characteristics of females, such as heifer pregnancy and stayability [4].

Description of testicular growth can be performed using nonlinear regression models. These models allow synthesizing information from longitudinal data in a few parameters that can be biologically interpreted [5].

¹ Universidade Federal de Viçosa

In this context, this study aimed to evaluate three nonlinear models to describe the SC growth curve in Tropical Montana composite bulls.

Material and Methods - Data used in this study are from Montana Tropical composite bulls raised in extensive management, born between 1997 and 2008. The animals were located in Magda/SP (20.6455° South, 50.2314° West), with average annual temperature of 22 °C and annual rainfall of 1200 mm.

Calving season occurs from August to November. After birth, calves are kept with their mothers in *Urochloa spp* pasture, with *ad libitum* water and mineral salt. Weaning is performed when calves reach 7-8 months of age. Testicular biometry was obtained annually at the time of the breeding soundness examination, which begins at 18 months of age.

The SC was measured by metric tape in the largest region of the scrotum, considering both testes positioned side by side. A total of 777 SC measurements from 269 bulls composed dataset. Ages at the moment of measurements ranged from 597 to 4019 days.

Growth curves were describe by three nonlinear models: Logistic: $SC_t = \frac{\beta_1}{1+\beta_2 e^{(-\beta_3 t)}} + e_i$; Brody: $SC_t = \beta_1 (1 - \beta_2 e^{(-\beta_3 t)}) + e_i$; and Michaelis-Menten: $SC_t = \frac{\beta_1 t}{t + \beta_2} + e_i$.

Where: SC_t is the scrotal circumference at t days; β_1 is the asymptote (value of SC at maturity); β_2 is an integration constant, for Michaelis-Menten model β_2 is the age (in days) in which $SC = \beta_1/2$; β_3 is the maturing index; and e_i is the error, assumed $e_i \sim NID(0, \sigma^2)$.

Residual autocorrelation was modeled with first order autoregressive errors ($AR(1)$) [6]. Goodness of fit was evaluated by: Akaike's information criterion (AIC), Bayesian information criterion (BIC) and adjusted coefficient of determination ($adj R^2$).

Results and Discussion - Parameter estimates and goodness of fit are presented in Table 1. Michaelis-Menten model showed the highest asymptotic (β_1) value, similar to results reported to Nellore bulls [7]. Logistic and Brody models presented similar values for asymptote and maturing index (β_3). Adjusted R^2 values were similar among models, being slightly higher in Michaelis-Menten model. Nevertheless, R^2 values in this study were lower than those reported to Nellore [7] and Guzerat [3] bulls. Values of AIC e BIC were lower for Michaelis-Menten model, indicating a better fitting to observed data.

Table 1. Parameter estimates (\pm standard error) and goodness of fit of nonlinear models used to describe the scrotal circumference growth curve in Composite Tropical Montana bulls

| Model | β_1 | β_2 | β_3 | AIC | BIC | Adj R^2 |
|------------------|------------------|--------------------|-----------------------|------|------|-----------|
| Brody | 41.99 \pm 0.45 | 0.37 \pm 0.03 | 0.00117 \pm 0.00016 | 3628 | 3642 | 0.4763 |
| Logistic | 41.89 \pm 0.42 | 0.49 \pm 0.05 | 0.00133 \pm 0.00017 | 3628 | 3642 | 0.4760 |
| Michaelis-Menten | 44.03 \pm 0.32 | 179.99 \pm 10.55 | - | 3626 | 3635 | 0.4772 |

β_1 = asymptote; β_2 = integration constant, for Michaelis-Menten model β_2 is the age in which $SC = \beta_1/2$; β_3 = maturing index. AIC = Akaike's information criterion; BIC = Bayesian information criterion; Adj R^2 = adjusted coefficient of determination

The SC growth curves obtained by the three models are presented in Figure 1.

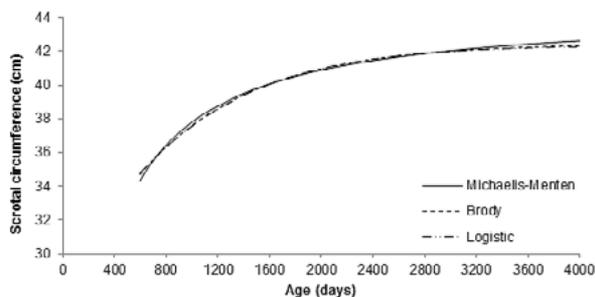


Figure 1. Scrotal circumference growth curves estimated by nonlinear models in Montana Tropical composite bulls

The Michaelis-Menten equation was originally used to correlate the rate of reaction with the amount of substrate [8], its use in animal growth curves has already been reported in zebu bulls, presenting good fitting to SC data in Nellore bulls [7].

In several nonlinear models used to describe SC growth curves, β_2 parameter is an integration constant without biological interpretation; nevertheless, for Michaelis-Menten model, this parameter represents the age in days of half final growth [8]. Thus, in this study β_2 may be considered as indicative of sexual precocity based on SC [7].

Conclusion - The Michaelis-Menten model presented the best fitting to observed longitudinal data of SC in Tropical Montana composite bulls.

There are relatively few reports in the literature about SC growth curve in Montana bulls, highlighting the need for further investigations.

References

- [1] **Sumário de touros Montana 2016**. São José do Rio Preto: Programa Montana Pecuária, 2016. 49 p.
- [2] Toelle YD, Robison OW. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. *J Anim Sci*, 1985;60:89-100.
- [3] Loaiza-Echeverri AM, Bergmann JAG, Toral FLB, Osorio JP, Carmo AS, Mendonça LF, Moustacas VS, Henry M. Use of nonlinear models for describing scrotal circumference growth in Guzarat bulls raised under grazing conditions. *Theriogenology*, 2013;79:751-9.
- [4] Santana Jr ML, Eler JP, Ferraz JBS, Mattos EC. Genetic relationship between growth and reproductive traits in Nellore cattle. *Animal*, 2012;6:565-70.
- [5] Fitzhugh Jr A. Analysis of growth curves and strategies for altering their shapes. *J Anim Sci*, 1976;33:1036-51.
- [6] SAS Institute Inc. 2014. **SAS/ETS[®] 13.2 User's Guide**. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- [7] Penitente-Filho JM, Villadiego FAC, Silva FF, Camilo BS, León VG, Peixoto T, Díaz E, Okano D, Maitan P, Lima D, Guimarães SE, Siqueira JB, Pinho R, Guimarães JD. Can scrotal circumference-based selection discard bulls with good productive and reproductive potential? *PLoS ONE* 2018;13: e0193103.
- [8] López S, France J, Gerrits WJJ, Dhanoa MS, Humphries DJ, Dijkstra J. A generalized Michaelis-Menten equation for the analysis of growth. *J Anim Sci*, 2000;78:1816-28.

Acknowledgments - Authors thank to Agropecuária CFM, CAPES, CNPq and Fapemig.

Influencia da estação do ano sobre o perfil bioquímico do ejaculado de ovinos

Marcelo Piagentini¹

E-mail: marcelopiagentini@yahoo.com

Danilo Cunha da Silva²

Carla Fredrichsen Moya-Araujo³

Gustavo H. Marques Araujo⁴

Rodrigo Garcia⁵

Eunice Oba⁵

Abstract: The present study aimed to evaluate the influence of the year's season at the biochemical profile of ovine ejaculate. Were used 10 animals, with reproductive age, similar size and weight, in an intensive system of production, in pens fed with hay, ration and mineral supplement at trough, with water *ad libitum*. The sperm were obtained by electroejaculation, with samples in every season (summer, autumn, winter and spring). The biochemical analyses were performed for fructose, citric acid, potassium, sodium, calcium, selenium, zinc, manganese, sulfur and lead. The obtained data were analyzed using the GLM process of SAA (1999). The difference among the means was verified using the Tukey test with 5% of significance. The year's season influence at the biochemical profile of ram's sperm were observed only at fructose mean concentration, showing no differences at citric acid, potassium, sodium, calcium, selenium, zinc, manganese, sulfur and lead, at the presented experiment conditions.

Keywords: biochemical analysis, ovine, semen.

Palavras-chave: análise bioquímica, ovino, sêmen.

Introdução - Os ovinos são considerados como animais sazonais de dias curtos, reproduzindo-se primordialmente nos meses que compõe as estações de outono e inverno em resposta ao decréscimo de duração de hora luz por dia. Diferentemente da ovelha, o macho sofre menos as alterações sazonais, mantendo a espermatogênese e atividade sexual o ano todo [1,2], porém, a qualidade do sêmen pode variar conforme a estação do ano [3]. O sêmen é composto por espermatozoides e plasma seminal. Este é produzido pelas glândulas acessórias, *rete testis* e epidídimo e serve como veículo para os espermatozoides no moneto da ejaculação. Os componentes bioquímicos do plasma, como aminoácidos, açúcares, proteínas e minerais,

¹ Faculdade Eduvale, Avaré-SP.

² Médico Veterinário Autônomo, Avaré-SP.

³ UNICENTRO, campus Cedeteg, Guarapuava-PR.

⁴ UFG/Regional de Jataí, Jataí-GO.

⁵ FMVZ/UNESP, Campus de Botucatu-SP.

ácido cítrico, são cruciais para a sobrevivência e função dos espermatozoides [4]. Diante do exposto anteriormente, o presente estudo teve por objetivo avaliar a influência da estação do ano sobre o perfil bioquímico do ejaculado de ovinos.

Material e Métodos - O experimento foi realizado no município de Iaras-SP, Brasil, clima subtropical, temperatura média de 26°C, latitude 22°52'15" sul e uma longitude 49°09'46" oeste a uma altitude de 648 metros. Foram utilizados 10 machos ovinos, em idade reprodutiva, peso semelhante, alimentados com feno e ração em sistema intensivo em baias. Estas eram de alvenaria com 5 metros de comprimento e 3 metros de largura, cobertas e com cochos de alimentação, suplementação mineral e água *ad libitum*. As amostras de sêmen foram colhidas, por meio de eletroejaculação conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA [5], em cada estação do ano. Para a determinação da concentração de frutose no sêmen seguiu-se o seguinte protocolo: em uma alíquota de sêmen total (0,2mL) foi adicionado 1 mL de hidróxido de sódio 0,5N e 1 mL de sulfato de zinco. Após a diluição as amostras foram acondicionadas em microtubos tipo eppendorf e armazenadas a -20°C para posterior determinação da concentração de frutose com uso da técnica proposta por Mann [6]. Para determinar a concentração de ácido cítrico no sêmen procedeu-se da seguinte forma: em uma alíquota de sêmen total (0,2mL) foi adicionado 1,8mL de ácido tricloro acético a 10%. Após a diluição, as amostras foram acondicionadas em microtubos tipo eppendorf e armazenadas a -20°C para posterior determinação da concentração de ácido cítrico conforme metodologia descrita por Saffran e Densted [7]. Já as concentrações de potássio (K), sódio (Na) e cálcio (Ca) no sêmen foram determinadas pela técnica íons seletivos. Enquanto que as concentrações de zinco (Zn), manganês (Mn), enxofre (S) no ejaculado foram determinadas pela técnica de Absorção Atômica em Chama, e as de selênio (Se), chumbo (Pb) determinadas por Absorção Atômica em Forno de Grafite. Os dados coletados para as características em consideração foram analisados utilizando o processo GLM descrito no SAS (1999). As diferenças entre médias foram verificadas com a aplicação do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão - Os resultados obtidos das dosagens bioquímicas do ejaculado estão descritas nas tabelas 1 e 2. Houve diferença estatística apenas na concentração média de frutose, não sendo observada diferença entre os demais parâmetros analisados no ejaculado ao longo do ano. Os resultados obtidos no presente estudo referentes à concentração média de frutose evidenciam informações quantitativas de açúcares presentes no ejaculado, tendo uma variação média de 15,73 a 41,47 mg/dL, entre as diferentes estações do ano, resultados esses, semelhantes ao descritos por Franco [8], cuja variação média de foi de 16,20 a 42,80 mg/dL, no ejaculado de ovinos. Tais informações são de fundamental importância, já que concentração média de frutose está relacionada à fertilidade, devido à produção de energia aos espermatozoides [9], dessa forma durante a estação reprodutiva (outono e inverno) as concentrações de frutose se mantiveram mais elevadas quando comparadas a primavera. No presente estudo a estação do ano não interferiu na concentração de K, Na, Ca, Se, Zn, Mn, S e Pb do ejaculado de ovinos. A atividade espermiática é totalmente dependente do ambiente

iônico. O ejaculado possui uma composição iônica que varia entre as espécies e também entre animais da mesma espécie [10], porém de acordo com os achados desse estudo não há variação de acordo com as estações do ano.

Tabela 1 - Média \pm erro padrão de frutose e ácido cítrico, potássio, sódio e cálcio no ejaculado de ovino de acordo com as estações do ano.

| Estação | Frutose (mg/dL) | A. cítrico (mg/dL) | Potássio (mmol/L) | Sódio (mmol/L) | Cálcio (mmol/L) |
|-----------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Primavera | 15,73 \pm 1,15 ^b | 6,25 \pm 1,47 ^a | 11,73 \pm 3,05 ^a | 140,17 \pm 7,83 ^a | 0,42 \pm 0,04 ^a |
| Verão | 35,78 \pm 3,73 ^a | 5,89 \pm 1,33 ^a | 9,14 \pm 1,06 ^a | 137,14 \pm 6,80 ^a | 0,31 \pm 0,01 ^a |
| Outono | 36,17 \pm 5,43 ^a | 5,93 \pm 1,44 ^a | 9,42 \pm 1,19 ^a | 133,08 \pm 1,06 ^a | 0,61 \pm 0,03 ^a |
| Inverno | 41,47 \pm 5,78 ^a | 6,53 \pm 1,54 ^a | 6,48 \pm 1,06 ^a | 136,00 \pm 1,65 ^a | 0,67 \pm 0,04 ^a |

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (Tukey; $p > 0,05$).

Tabela 2 - Média \pm erro padrão da média de selênio, zinco, manganês, enxofre e chumbo no ejaculado de ovino de acordo com as estações do ano.

| Estação | Se (μ g/dL) | Zn (mg/L) | Mn (mg/L) | S (mg/L) | Pb (mg/L) |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| Primavera | 0,045 \pm 0,004 ^a | 0,34 \pm 0,022 ^a | 0,57 \pm 0,110 ^a | 15,74 \pm 2,48 ^a | 1 \times 10 ⁻³ \pm 0 ^a |
| Verão | 0,022 \pm 0,003 ^a | 0,35 \pm 0,026 ^a | 0,32 \pm 0,032 ^a | 21,53 \pm 3,03 ^a | 1 \times 10 ⁻³ \pm 0 ^a |
| Outono | 0,034 \pm 0,002 ^a | 0,32 \pm 0,033 ^a | 0,32 \pm 0,056 ^a | 16,56 \pm 1,98 ^a | 1 \times 10 ⁻³ \pm 0 ^a |
| Inverno | 0,052 \pm 0,018 ^a | 0,24 \pm 0,045 ^a | 0,28 \pm 0,086 ^a | 19,03 \pm 3,32 ^a | 1 \times 10 ⁻³ \pm 0 ^a |

Letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si (Tukey; $p > 0,05$).

Considerações Finais - A influência da estação do ano, sobre o perfil bioquímico do ejaculado de ovinos, foi observada apenas na concentração média de frutose, não tendo efeito sobre as concentrações médias de ácido cítrico, potássio, sódio, cálcio, selênio, zinco, manganês, enxofre e chumbo, sob as condições experimentais desse estudo.

Referências Bibliográficas

- [1] ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research*, v.48, p.155-171, 2003.
- [2] DICKSON, K. A.; SANFORD, L. M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. *Small Ruminant Research*, v.56, p.189-203, 2005.
- [3] KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.249-56, 2008.
- [4] ASSUMPÇÃO, T.I., TORRES JÚNIOR, R.A.A., SOUSA, M.V., RICART, C.A.O. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.1, p.55-61, 2005.
- [5] COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- [6] MANN, T. Fructose content and fructolysis in semen; practical application on the evaluation of semen quality. *Journal of Agricultural Science*, v.38, n.3, p.323-331, 1948.

[7] SAFFRAN, M.; DENSTEDT, O.F. A rapid method for the determination of citric acid. **The Journal of Biological Chemistry**, v.175, n.2, p.849-855, 1948.

[8] FRANCO, H.J.A. **Purificação da fosfolipase A2 e análise bioquímica do ejaculado de ovinos e caprinos** [dissertação]. São Carlos: Instituto de Química, Universidade de São Paulo; 2010.

[9] TUTIDA, L.; BARBOSA, O.R.; MARTINS, E.N.; MACEDO, F.A.F.; MORAES, G.V. Influência das estações do ano na concentração de ácido cítrico e frutose no sêmen de carneiro. **Acta Scientiarum**, v.56, p.607-612, 1999.

[10] KARAGIANNIDIS, A.; VARSAKELI, S.; KARATZAS, G. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goats bucks born raised in Greece. **Theriogenology**, v.53, n.6, p.1285-1293, 2000.

Agradecimentos - A FAPESP pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desse estudo (Processo no. 2012/50277-6).

Efeito da estação do ano e do horário do dia sobre os parâmetros dopplervelocimétricos da artéria testicular de ovinos adultos criados em clima tropical úmido

Juliana Nascimento Duarte Rodrigues¹

Autor para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av Peter Henry Rolfs, Campus Universitário, Viçosa, MG, 36571-000. E-mail: julianarodriguesmv@gmail.com

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹

Camilo José Ramírez López¹

Celina Alves de Oliveira¹

Rafael Souza Freitas²

Thialla Emille Costa do Nascimento³

Erick Fonseca de Castilho^{3,1}

Luiz Fernando de Souza Rodrigues³

José Domingos Guimarães¹

Orientador: jdguima.ufv@gmail.com

Abstract: The objective was to evaluate the dopplervelocimetric parameters of the testicular artery of rams at different times of the day in Amazon winter and summer, as well as to correlate them the climatic variables. Experimental period was: winter (P1) and summer (P2). Expectral Doppler was performed at three times of the day (H1, H2 and H3) to obtain the indexes of resistivity (IR) and pulsatility (IP). The climatic parameters recorded were dry bulb temperature (Tbs), relative humidity (URA) and temperature and humidity index (ITU). Dopplervelocimetric parameters didn't differ between times of day in P1 ($P>0,05$); however, in P2, it were observed smaller values in H1 than H2 and H3 ($P<0,05$). There were lower values dopplervelocimetrics in winter ($P<0,05$). The IP and IR presented correlation with climatic parameters. It was concluded that the dopplervelocimetric parameters were lower in winter and there was correlation between the climatic variables and the dopplervelocimetric parameters.

Keywords: climatic; pulsatility; resistivity.

Palavras-chave: climáticas; pulsatilidade; resistividade.

Introdução - A criação de ovinos em clima tropical úmido, como no norte brasileiro, nem sempre é favorável, pois as condições amazônicas apresentam-se como agente estressor devido às altas temperatura e umidade relativa do ar durante todo o ano, com médias de temperatura de 27,5°C e umidade relativa do ar de 83,6% no ano de 2016 [1]. Essas adversidades

¹ Universidade Federal de Viçosa

² Universidade da Amazônia

³ Universidade Federal Rural da Amazônia

climáticas alteram as condições fisiológicas dos animais, podendo afetar negativa e significativamente a temperatura corporal devido ao estresse calórico, ocasionando o declínio na produção e consequentemente na eficiência reprodutiva destes animais. A manutenção térmica da pele escrotal é afetada pela temperatura ambiente, umidade relativa do ar, temperatura corporal, quantidade de calor perdido por radiação do escroto, postura do animal, índice de obesidade do animal e integridade escrotal [2]. Uma das respostas ao aumento de temperatura é um maior fluxo sanguíneo no escroto, que contribui para a termorregulação, facilitando a perda de calor por irradiação e evaporação. A elevação da temperatura testicular aumenta o metabolismo e a demanda de oxigênio pelas células do epitélio seminífero, porém seu fluxo sanguíneo pode ser limitado e incapaz de suprir essa demanda, podendo resultar em hipóxia e redução da qualidade seminal [3]. O triplex Doppler (ultrassonografia modo B + doppler colorido + doppler espectral) em é uma técnica segura e indolor que pode ser utilizada para determinar a presença, a direção e o tipo do fluxo sanguíneo no escroto, como realizado por [4] em caprinos. Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da estação do ano sobre os parâmetros dopplervelocimétricos da artéria testicular de ovinos adultos em diferentes horários do dia, bem como correlacionar os parâmetros dopplervelocimétricos com variáveis climáticas durante as estações inverno e verão na região Amazônica Oriental.

Material e Métodos - O trabalho foi realizado no ano de 2016 e dividido de acordo com o regime de chuvas: P1 – período mais chuvoso (inverno amazônico), nos meses de fevereiro e março de 2016, e P2 – período menos chuvoso (verão amazônico), nos meses de agosto e setembro de 2016. As coletas de dados ultrassonográficos foram realizadas em três horários do dia (H1 - 8:00h, H2 - 12:00h e H3 - 17:00h), duas vezes por semana, durante seis semanas. O experimento foi realizado na cidade de Belém-PA, onde o clima é caracterizado como Af (tropical úmido), de acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger. Foram utilizados 7 carneiros Santa Inês, hípidos, com idade entre 2 e 3 anos, aptos a reprodução e sob o mesmo manejo alimentar. Os dados climáticos foram registrados nas datas e horários pré-estabelecidos para a realização do experimento com o intervalo de 30 minutos durante o período experimental. Foi utilizada uma estação meteorológica (INCOTERM – NEXUS Funk Wetterstation) para o registro dos dados das variáveis climáticas (temperatura e umidade relativa do ar - URA) e, por meio de equipamentos analógicos foram obtidas a temperatura do bulbo seco (Tbs) e temperatura de bulbo úmido (Tbu). Os dados de Tbs e URA foram utilizados na determinação do Índice de Temperatura e Umidade (ITU). As avaliações ultrassonográficas foram realizadas com aparelho VET Gold (Esaote®), equipado com transdutor multifrequencial linear (6 a 18 MHz). Os animais mantinham-se em posição quadrupedal e o transdutor posicionado diretamente sobre o cordão espermático. Para a execução do modo Doppler espectral foi preconizado para todos os exames o ângulo de insonação de 0° e o ganho da cor de 76, permitindo o mapeamento adequado do fluxo dos vasos sanguíneos. Em cada cordão espermático, foi obtida uma imagem com o transdutor em posição longitudinal em modo triplex Doppler (modo B + Doppler colorido + Doppler espectral) para posterior análise. Para a avaliação do fluxo, a caixa de cor permaneceu mantida em tamanho médio e com o menor volume de amostragem (gate) para mensurar as velocidades no centro do vaso,

utilizando-se assim do método de “máxima velocidade”. Após a localização da artéria testicular na sua porção do cordão espermático, o gate era posicionado na porção central do vaso para a obtenção de três espectros similares e consecutivos para a análise espectral dos índices de resistividade (IR) e pulsatilidade (IP) realizada manualmente com o auxílio do programa de computador MyLab_Desk. Os dados foram analisados em modelos mistos lineares [5] com medidas repetidas no tempo, estrutura de covariâncias autorregressiva e animal como efeito aleatório [6]. Para avaliação da relação entre as variáveis foi feita a correlação simples de Pearson. O nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

Resultados e Discussão - Os valores médios e erros-padrão das variáveis climáticas nos no inverso e verão amazônicos foram, respectivamente: Tbs ($28,0 \pm 0,31$ e $30,9 \pm 0,30$); URA ($84,1 \pm 0,88$ e $69,9 \pm 0,88$) e ITU ($80,1 \pm 0,47$ e $82,5 \pm 0,24$). Houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as estações para todos os parâmetros. As médias e erros-padrão dos índices de pulsatilidade e resistividade da artéria testicular estão apresentadas na tabela 1. Houve interação horário e estação para as duas variáveis ($P<0,05$). Os valores de IP e IR não diferiram ($P>0,05$) entre os horários no inverno, no entanto, no verão, o H1, com valores menores, diferiu ($P<0,05$) dos outros dois horários. Verificou-se menores valores de IR e IP no inverno, o que sugere uma maior perfusão testicular neste período. A temperatura do ar na região amazônica se mantém alta nas duas estações, no entanto, a umidade relativa do ar é consideravelmente maior no inverno amazônico, gerando assim um ITU mais elevado, o que leva a um maior desconforto térmico nos animais e consequentemente maiores alterações fisiológicas a fim de manter a homeotermia corporal e testicular.

Tabela 1. Média e erro padrão dos índices de pulsatilidade (IP) e de resistividade (IR) da artéria testicular de carneiros Santa Inês em três diferentes horários do dia e no inverno e verão amazônicos.

| | P1 – Inverno amazônico | | | P2 – Verão amazônico | | |
|-----------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 08h | 12h | 17h | 08h | 12h | 17h |
| IP | $1,11 \pm 0,05^{Aa}$ | $1,09 \pm 0,05^{Ba}$ | $1,01 \pm 0,05^{Ba}$ | $1,42 \pm 0,05^{Ab}$ | $1,79 \pm 0,05^{Aa}$ | $1,85 \pm 0,05^{Aa}$ |
| IR | $0,42 \pm 0,06^{Aa}$ | $0,41 \pm 0,06^{Ba}$ | $0,36 \pm 0,06^{Ba}$ | $0,56 \pm 0,06^{Ab}$ | $0,69 \pm 0,06^{Aa}$ | $0,70 \pm 0,06^{Aa}$ |

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e em cada grupo de idade diferem entre si ($P<0,05$); médias seguidas de letras maiúsculas diferentes e no mesmo horário diferem entre si ($P<0,05$).

A correlação entre as variáveis climáticas e os parâmetros dopplervelocimétricos da artéria testicular de ovinos, está relatada na tabela 2. O IP e o IR apresentaram correlação positiva com Tbs e negativa com ITU e URA. Não se pode afirmar que a temperatura influenciou positivamente os índices de resistividade e pulsatilidade, mesmo que tenha mostrado correlação positiva com estes, pois sofreu interferência da alta umidade da região de estudo. A correlação negativa com o ITU demonstra que quanto maior o índice de temperatura e umidade, menor será a resistividade e pulsatilidade vascular, gerando um aumento de perfusão no órgão irrigado pelo vaso.

Tabela 2. Correlação Simples de Pearson entre os índices de pulsatilidade (IP) e resistividade (IR) e os parâmetros climáticos.

| | Tbs | URA | ITU |
|-----------|------------|------------|------------|
| IP | 0,41 | -0,52 | -0,31 |
| IR | 0,42 | -0,54 | -0,34 |

($P < 0,05$); TBS = temperatura de bulbo seco; URA = umidade relativa do ar; ITU = índice de temperatura e umidade.

Considerações Finais - Neste trabalho, os índices de pulsatilidade e resistividade da artéria testicular de ovinos criados em clima tropical úmido foram menores no inverno amazônico ($P < 0,05$), apenas o H1 no verão amazônico teve valores significativamente diferentes dos outros horários do dia ($P < 0,05$) e houve correlação entre as variáveis climáticas e os parâmetros dopplervelocimétricos da artéria testicular destes animais.

Referências Bibliográficas

- [1] INMET. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa** (BDMEP). 2016.
- [2] Klein BG. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. Elsevier Brasil, 2015.
- [3] Kastelic JB, Cook RB, Coulter GH, Saacke RG. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 935-942, 1996.
- [4] Batissaco I, Celeghini ECC, Pinaffi FLV, De Oliveira BMM, De Andrade AFC, Recalde ECS, Fernandes CB. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 384-395, 2014.
- [5] Cary, NC: SAS Institute Inc. SAS Institute Inc 2002: **SAS/STAT[®] 9.0 User's guide**.
- [6] Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O. **SAS[®] for mixed models**, 2nd edn. Cary, NC: SAS Institute Inc. 814p. 2006.

Agradecimentos - Agradecimento a CAPES, CNPq e Fapemig e pesquisadores envolvidos para a execução do trabalho.

Efeito paradoxal do antioxidante quercetina sobre a cinética e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação

Marcelo Sant'Ana Borges¹

Joana Larissa Barbosa Born¹

Ana Carolina Silva Teixeira¹

Letícia Martins Conti¹

Frederico Ozanam Papa²

José Antônio Dell'Aqua Jr.²

André Maciel Crespilho^{1,3}

andremacc@yahoo.com.br

Abstract: The objective of the study was to evaluate the incorporation of different concentrations of Quercetin (QC) to the semen extender used for frozen goat sperm. Semen of 4 Anglo-Nubian bucks (n=4 samples/goat) was collected and diluted in Ringer's solution at 37°C for the removal of seminal plasma by centrifugation. The sperm samples were diluted in TRIS-fructose extender to compose 4 experimental groups: Control (G1, without QC), G2, G3 and G4 to which were added 10µM (before centrifugation), 10µM (after centrifugation) or 20µM (10 before and 10 after the centrifugation) of Quercetin, respectively. After frozen-thawed procedure were observed a reduction in sperm motility (P=0.0014), progressivity (P=0.0029) and velocity (P<0.0001) in the Quercetin treatments. The plasma membrane integrity was better preserved (P=0.0154) in control group (35.47%) than in QC groups (G2=32.56%; G3=32.38% and G4=26.74%). In conclusion, even using doses recommended by the literature, the antioxidant Quercetin has toxic effects for goat spermatozoa.

Palavras-chave: bode; EROS; congelação.

Keywords: goat; freezing; ROS.

Introdução - A criopreservação espermática possui papel importante nos programas de melhoramento genético animal. Entretanto, o processo de congelação do sêmen resulta em crioinjúrias às membranas plasmática e acrossomal, determinando a queda significativa da cinética e fertilidade espermática. Uma das principais consequências do processo de criopreservação representa a formação exacerbada de espécies reativas a oxigênio (EROS), que atuam induzindo estresse oxidativo e peroxidação lipídica, resultando em danos irreversíveis aos espermatozoides [1].

¹ Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo/SP

² Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu/SP

³ Universidade Severino Sombra, USS, Vassouras/RJ

Em virtude da interação deletéria entre o plasma seminal (PS) caprino e os constituintes dos meios diluidores a base de gema de ovo torna-se indispensável a remoção do PS previamente ao processamento das amostras espermáticas dessa espécie. Embora considerado procedimento benéfico para a criopreservação do sêmen caprino, estudos anteriores demonstraram que a centrifugação espermática pode favorecer a geração de EROS [2], havendo a necessidade de proteção das células durante o processamento.

Nesse contexto, estudos recentes têm demonstrado resultados promissores com a utilização do antioxidante quercetina (QC) para a proteção de espermatozoides bovinos [3] e equinos [4] durante o processo de criopreservação. Entretanto, segundo Seifi-Jamadi *et al*[5], esse antioxidante pode apresentar efeito paradoxal dose-dependente sobre a qualidade espermática, onde altas doses de QC foram associadas à queda da cinética e integridade de espermatozoides caprinos.

O objetivo do estudo foi avaliar a influência da incorporação de QC em diferentes fases do processo de criopreservação sobre a cinética e integridade estrutural de espermatozoides caprinos pós-descongelamento. O estudo testa ainda a hipótese de um possível efeito paradoxal da suplementação de quercetina sobre a qualidade do sêmen caprino congelado.

Material e Métodos - Foram selecionados 4 bodes (*Capra hircus*), raça Anglo Nubiano, com idade média de 30 meses pertencentes a mini fazenda da Universidade Santo Amaro, São Paulo/SP. Para inclusão no experimento foram considerados o histórico clínico e reprodutivo dos animais, além de exame andrológico completo como teste de triagem. Todos os animais passaram por um período de adaptação e nivelamento biológico no qual os ejaculados foram colhidos 2 vezes por semana durante 30 dias através de vagina artificial própria para a espécie. Para execução das avaliações laboratoriais previstas no experimento foram colhidos 4 ejaculados de cada animal, totalizando 16 amostras espermáticas. Imediatamente após a colheita do sêmen foi retirada uma alíquota de cada ejaculado para avaliação dos critérios de inclusão definidos para o trabalho. Após a triagem inicial de qualidade cada ejaculado foi diluído em solução de tampão fosfato salino (PBS) previamente aquecido a 37°C de forma a fixar o volume final em 10mL. As amostras foram divididas em duas partes iguais em tubos de 15ml, onde 10µM/ml de Quercetina [5] foram adicionados em uma das partes (grupo tratado), sendo que o grupo controle permaneceu sem acréscimo de antioxidantes. O material diluído foi submetido a centrifugação (500g/10 minutos) para retirada do PS através do descarte do sobrenadante. As amostras livres de PS foram ressuspensas em meio TRIS gema de ovo frutose contendo 6,4% de glicerol⁶ de forma a respeitar a concentração final em 120x10⁶ espermatozoides/mL. O material resultante da centrifugação foi novamente dividido para formar 4 grupos experimentais: Grupo 1 Controle (diluição em TRIS sem adição de antioxidantes); Grupo 2 (G2, adição de 10 µM/mL de QC após a centrifugação); Grupo 3 (G3, recebeu a adição de 10µM/mL de QC antes da centrifugação) e Grupo 4 (G4, recebeu a adição de 10µM/mL de QC antes e mais 10µM/mL de QC após a centrifugação totalizando 20µM/mL). Amostras dos 4 grupos experimentais foram envasadas em palhetas de 0,5ml, refrigeradas e criopreservadas de acordo com metodologia proposta por Crespilho *et al*[6].

Após a descongelação a 36°C/30seg a qualidade do movimento espermático, de acordo com cada grupo experimental, foi avaliada através do sistema ISAS® V.1.2 (Proiser, Valencia, Espanha), considerado os parâmetros motilidade espermática total (MT, %) e progressiva (MP, %); velocidade real de trajeto (VAP, µm/s); linearidade espermática (LIN, %); percentual de espermatozoides rápidos (RAP, %). Para a determinação da integridade de membrana plasmática (IMP, %) foi utilizada a combinação de sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (PI), de acordo com técnica adaptada de Crespilho *et al*[6], através de microscopia de epifluorescência. Para cada amostra/grupo experimental foram avaliadas 200 células espermáticas. Para as análises estatísticas foi empregado modelo linear geral de análise de variância (GLM-SAS®).

Resultados e Discussão - De acordo com a metodologia proposta foi observada interação negativa entre a incorporação de QC sobre a cinética e integridade de espermatozoides caprinos, havendo redução na MOT (P=0,0014), MP (P=0,0029), VAP (P<0,0001), RAP (P<0,0001) e IMP (P=0,0154), de acordo com a Tabela 1 abaixo. Embora Seifi-Jamadi *et al*[5], tenham reportado melhora significativa na criotolerância de espermatozoides caprinos suplementados com 10µM/mL de QC, nossos resultados indicaram efeito adverso desse antioxidante quando adicionado nas mesmas concentrações (G2 e G3) sobre o sêmen criopreservado de bodes. De acordo com Khanduja *et al*[7] a redução cinética modulada pela Quercetina provavelmente se justifica pela interação desse antioxidante com a enzima Ca²⁺-ATPase presente na membrana plasmática dos espermatozoides, que pode causar distúrbios da concentração de Cálcio (Ca²⁺) intracelular, resultando em queda na capacidade de movimento espermático.

Tabela 1- Efeito da incorporação do antioxidante quercetina (média±SE) sobre as características cinéticas e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação, de acordo com cada grupo experimental. Onde G1: Grupo Controle (sem incorporação de quercetina); G2: Incorporação de 10 µmol de quercetina/ml de diluidor previamente à centrifugação do sêmen; G3: Incorporação de 10 µmol/ ml de diluidor previamente à criopreservação do ejaculado; G4: Incorporação de 10 µmol de quercetina/ml de diluidor previamente à centrifugação e mais 10 µmol/ ml antes da congelação do sêmen (total de 20 µmol de quercetina/ml).

| Parâmetros | G1 | G2 | G3 | G4 |
|------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| MOT (%) | 56,82 (4,14) ^A | 42,35 (3,93) ^B | 40,94 (4,59) ^B | 37,53 (3,93) ^B |
| MP (%) | 24,71 (1,86) ^A | 18,94 (2,12) ^B | 18,12 (2,44) ^B | 15,59 (2,09) ^B |
| VAP (µm/s) | 58,35 (2,13) ^A | 50,65 (3,34) ^B | 51,00 (2,79) ^B | 50,18 (2,23) ^B |
| LIN (%) | 49,29 (2,12) ^A | 49,41 (1,30) ^A | 46,59 (2,58) ^A | 47,41 (2,06) ^A |
| RAP (%) | 37,18 (3,55) ^A | 24,88 (3,53) ^B | 24,24 (3,84) ^B | 21,59 (3,75) ^B |
| IMP (%) | 35,47 (1,70) ^A | 32,56 (2,15) ^{AB} | 32,38 (2,43) ^{AB} | 26,74 (2,92) ^B |

^{A,B} Letras diferentes na mesma linha expressam as diferenças estatísticas encontradas. Onde MOT: motilidade espermática total pós-descongelação; PROG: motilidade espermática progressiva pós-descongelação; VAP: velocidade de trajeto; LIN: linearidade espermática; RAP: percentual de espermatozoides rápidos da amostra; IMP: integridade de membrana plasmática.

Não foram observados efeitos adjuvantes da QC quando incorporada nos momentos pré ou pós-centrifugação. De acordo com os resultados de integridade de membrana plasmática pode-se concluir que os efeitos adversos desse antioxidante se manifestaram de forma “dose-dependente”, tendo em vista as lesões estruturais às células espermáticas foram mais pronunciadas no G4 em relação aos demais grupos experimentais.

Considerações Finais - Mesmo empregando doses preconizadas pela literatura foram observados efeitos adversos da Quercetina à cinética e integridade de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação. Não foram observadas interações entre a qualidade do sêmen pós-descongelamento com os diferentes momentos (pré ou pós centrifugação) em que o antioxidante foi incorporado sendo, no entanto, observado efeito paradoxal dose dependente. Dessa forma, conclui-se que nas concentrações utilizadas a Quercetina apresenta toxicidade para o sêmen caprino.

Referências Bibliográficas

- [1] KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Animal reproduction science*, v. 114, n. 1-3, p. 125-134, 2009.
- [2] TWIGG, J.; IRVINE, D. S.; HOUSTON, P.; FULTON, N.; MICHAEL, L.; AITKEN, R. J. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Molecular human reproduction*, v. 4, n. 5, p. 439-445, 1998.
- [3] LUZ, J. B. **Adição de extrato de açaí ao diluente de criopreservação do sêmen de touros**. 2018. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) — Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém – Pará. 46p.
- [4] SILVA, L. F. M. C. et al. **Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelamento**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) — Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP. 94p.
- [5] SEIFI-JAMADI, A., AHMAD, E., ANSARI, M., KOHRAM, H. Antioxidant effect of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezing capacity of goat semen. *Cryobiology*, v. 75, p. 15-20, 2017.
- [6] CRESPILO, A.M.; NICHI, M.; GUASTI, P. N.; FREITAS-DELLAQUA, C. P.; SÁ FILHO, M. F.; MAZIERO, R. R.; DELLAQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, 146, p. 126-133, 2014.
- [7] KHANDUJA, K. L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrologia*, v. 33, n. 5, p. 277-281, 2001.

Seminoma associado a queda de fertilidade em equino: relato de caso

Juliana Horta Wilke Diniz¹

julianahortawd@gmail.com

Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva²

Isabella Macedo Coutinho¹

Deborah Freitas Silva¹

Leticia de Oliveira Cota¹

Bruno Dondoni Malacarne¹

Beatriz Novaes Telles Ribeiro¹

Felipe Pierezan¹

Andressa Batista da Silveira Xavier¹

Gabriel Augusto Monteiro¹

monteiroga@yahoo.com.br

Abstract: Seminomas are rare testicular neoplasms found in horses, with a higher prevalence in those with advanced age or cryptorchidic testicles. Originating in the germinal epithelium, the seminomas have variable microscopy and are diagnosed by cytological and histopathological exams. The aim of the present report is to describe the case of a 12-years-old equine, with a history of right testicular enlargement, associated with significant decrease in seminal quality and fertility. The ultrasound examination of the right testicle revealed hyperechoic areas with a heterogeneous pattern in the parenchyma. Thus, a unilateral orchiectomy of the right testicle was recommended, followed by histopathological evaluation. Considering all the clinical, ultrasound and mainly the histopathological findings the diagnosis of right unilateral seminoma was established. Surgical removal of the affected testis provided the recovery of the healthy contralateral testis, allowing the stallion maintenance in the reproductive activity.

Keywords: andrology, spermatozoa, testicular tumor.

Palavras-chave: andrologia, espermatozoide, tumor testicular.

Introdução - As neoplasias testiculares são condições patológicas que raramente ocorrem em equinos e majoritariamente de maneira unilateral [1]. Fatores como idade e criptorquidismo, são condições predisponentes no desenvolvimento dessas afecções. A maioria dos tumores encontrados são originados de células especializadas que compõem o parênquima testicular. Em vista disso, a classificação é baseada na célula de origem: tumores originados

¹ Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

² Universidade Federal de Viçosa – UFV

das células de Leydig são denominados leydigocitoma; Sertolioma, o das células de Sertoli e seminoma aqueles originados do epitélio germinativo [2]. Dentre esses, o tumor mais comumente encontrado em equinos é o seminoma [1,3].

Macroscopicamente o seminoma caracteriza-se por aumento de volume testicular, com formações nodulares esbranquiçadas, moles e com pouca resistência à palpação. Ao corte, deixa fluir um líquido viscoso [2]. O aspecto e aparência dos tumores são variáveis. Este fato dificulta seu diagnóstico por exame ultrassonográfico e/ou avaliação macroscópica da lesão. Portanto, nos casos em que os exames levem à suspeita de neoplasias testiculares, o diagnóstico definitivo é baseado nos exames citológicos ou histopatológicos [4].

No exame ultrassonográfico os tumores normalmente se apresentam como estruturas heterogêneas localizadas no parênquima testicular [4]. Histologicamente, os seminomas são classificados nas formas intratubular ou difusa, apresentando infiltrado linfocitário multifocal no interstício [2]. A recomendação para os casos de tumores testiculares é a orquiectomia do testículo afetado, evitando assim a disseminação da doença e comprometimento do testículo contralateral. A recuperação da espermatogênese no testículo contralateral, nos casos em que este foi degenerado, vai depender do tempo de duração e do grau da degeneração. Nesse contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito do seminoma na qualidade seminal, características ultrassonográficas e histopatológicas em um garanhão da raça campolina.

Relato de Caso - Foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade federal de Minas Gerais - UFMG, um garanhão da raça campolina (12 anos) com queixa de aumento progressivo do testículo direito com evolução de 7 meses. Na estação de monta anterior ao desenvolvimento da neoplasia, o reprodutor apresentou taxa de concepção de 84% com inseminações com sêmen fresco e refrigerado (42 diagnósticos positivos/50 inseminações). Finalizada estação reprodutiva, o animal permaneceu 5 meses em repouso sexual (de abril a agosto). Ao iniciar as coletas de sêmen para iniciar a estação subsequente, observou-se queda expressiva da qualidade seminal e fertilidade. No exame do sistema reprodutor constatou-se edema prepucial leve, mobilidade reduzida em ambos testículos, testículo esquerdo com formato ovoide e consistência flácida (dimensões de 10x7x6 cm) e testículo direito redondo, apresentando consistência firme (dimensões 14x10x12 cm). No exame ultrassonográfico do testículo direito foi constatada massa com áreas hiperecóticas com padrão heterogêneo e dimensão de 11x8x8 cm. Já o testículo esquerdo apresentou parênquima hipoecótico e com áreas levemente heterogêneas.

No exame macroscópico, o ejaculado apresentou 16 mL, aspecto aquoso, odor “suis generis” e coloração branco acinzentada. Os parâmetros microscópicos do ejaculado foram: motilidade total 40%, motilidade progressiva 20%, vigor 3, concentração 300×10^6 espermatozoides/ml e $4,8 \times 10^9$ espermatozoides totais. O exame morfológico espermático foi feito com método de coloração eosina-nigrosina. Em relação aos defeitos espermáticos, o sêmen apresentou 53% de defeitos totais, 19% de defeitos menores e 34% de defeitos maiores. Dentre os defeitos maiores, cauda fortemente dobrada ou enrolada foi encontrada em maior quantidade (16%). O defeito menor com maior porcentagem na amostra foi de gota citoplasmática

distal (20%). Com base nos achados clínicos e ultrassonográficos, suspeitou-se que o animal apresentava neoplasia testicular e optou-se pela orquiectomia unilateral direita.

O procedimento cirúrgico foi realizado sob anestesia geral inalatória em decúbito dorsal. A antisepsia do escroto foi realizada com Digliconato de Clorexidina 2% seguida da incisão cutânea de forma abaxial, aproximadamente a 8 cm da rafe mediana, para assim minimizar a manipulação cirúrgica do testículo contralateral. Havia aderências da pele à túnica dartos, a qual foi seccionada para permitir a exteriorização do testículo antes da abertura da túnica vaginal. O cordão espermático, e seus componentes, foi ligado em bloco com fio catagute cromado 4. As bordas da incisão foram suturadas e o centro deixado para cicatrizar por segunda intenção. O equino recebeu penicilina (30.000 UI/kg) e fenilbutazona (2,2 mg/kg) uma vez ao dia por 5 dias. A cicatrização ocorreu sem eventualidades.

Macroscopicamente, o parênquima testicular (aproximadamente 80%) apresentava proliferação neoplásica de 11x8x8 cm, multilobulada, castanho-amarelada, com áreas multifocais deprimidas e firmes. Microscopicamente, observou-se substituição difusa do parênquima testicular por proliferação de células germinativas neoplásicas, em arranjo sólido, sem presença de cápsula, infiltrativa e não delimitada, sustentada por fino estroma fibrovascular. As células neoplásicas eram arredondadas, ovaladas ou poliédricas, e apresentavam citoplasma eosinofílico finamente granular escasso a abundante. Os núcleos eram grandes e arredondados. Anisocitose e anisocariose eram acentuadas. Foram observadas duas a três mitoses por campo de maior aumento (400x). Diante dos achados histopatológicos, concluiu-se que o animal apresentava seminoma unilateral.

Oito meses após o tratamento o animal não apresentou nenhuma alteração clínica, com motilidade espermática de 70%, Vigor 3 e com fertilidade de 65%.

Discussão - O histórico do animal, associado a avaliação andrológica e ultrassonográfica, levaram à suspeita de tumor testicular, que foi confirmada após a avaliação histológica, estabelecendo o diagnóstico de seminoma. O garanhão do presente estudo possuía 12 anos de idade, corroborando com relatos que associam esse tipo de tumor à idade avançada em equinos, os quais descrevem casos em animais com mais de 10 anos de idade [3,5].

Assim como observado no presente relato, quando o testículo é afetado por seminoma apresenta-se aumentado de volume e com consistência firme à palpação [2]. Além disso, as imagens obtidas no exame ultrassonográfico, são compatíveis com as encontradas em casos de seminomas descritos em equinos, caracterizando-se por imagem heterogênea com aumento da ecogenicidade no parênquima testicular [4,6]

O seminoma, por se tratar de um tumor de células germinativas, afeta negativamente a espermatogênese, o que pode acarretar em redução dos parâmetros de cinética e aumento de alterações morfológicas, como observado em estudo feito em homens [7]. A desordem causada na produção de espermatozoides justifica a, menor motilidade total e progressiva, e alta porcentagem de defeitos morfológicos, em comparação com parâmetros espermáticos recomendados para reprodutores equinos [8].

O padrão de alterações morfológicas espermáticas constatado no caso (alta incidência de cauda fortemente dobrada ou enrolada e gota citoplasmática distal), contrapõem aos resultados anteriormente descritos em quadros de seminoma [3]. Esta divergência provavelmente ocorreu pelo fato dos espermatozoides presentes no ejaculado originarem-se do testículo esquerdo (contralateral ao neoplásico) e não do testículo com seminoma, esta hipótese é sustentada pelo exame macroscópico que constatou proliferação neoplásica em quase todo o parênquima testicular afetado o que impossibilita a produção espermática. Entretanto, o aumento de volume do testículo neoplásico causou redução de mobilidade do testículo esquerdo e pode ter afetado a sua capacidade de termorregulação, causando injúrias aos espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo, tendo assim o padrão de morfologia encontrado, com defeitos oriundos da maturação espermática.

O diagnóstico definitivo de tumor testicular é feito através da histopatologia. O material biológico pode ser obtido através de biópsia testicular, citologia aspirativa [5] ou castração. Optou-se por remover cirurgicamente o testículo afetado, por se tratar da conduta terapêutica recomendada em casos de tumor testicular [3]. O resultado da histopatologia foi semelhante à macro e microscopia de seminoma que caracterizam as células germinativas do epitélio seminífero como células arredondadas ou ovaladas, com núcleos grandes, por vezes duplo [2]. E a acentuada anisocitose e anisocariose é comum em regiões neoplásicas.

Conclusões - Conclui-se que o quadro observado é de tumor de células germinativas do testículo, denominado de seminoma. O exame ultrassonográfico foi importante para identificar uma perda da arquitetura normal no testículo. Porém, o exame histopatológico foi fundamental para a confirmação da suspeita. A orquiectomia unilateral realizada para tratamento do caso foi eficiente e possibilitou a recuperação da qualidade seminal e fertilidade do reprodutor.

Referências Bibliográficas

- [1] McENTEE, K., **Scrotum, spermatic cord, and testis: proliferative lesions**. In: Reproductive Pathology of Domestic Animals. Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp. 279–306. 1990.
- [2] SANTOS, R. L.; ALESSI, A.C.; Patologia veterinária. São Paulo: Roca, 2014. 892 p.
- [3] BRINSKO, S.P. Neoplasia of the male reproductive tract. **Vet Clin North Am Equine Pract.**, v.14, p.517–533. 1998.
- [4] TURNER, R.M. Ultrasonography of the genital tract of the stallion. In: REEF, V.B. **Equine Diagnostic Ultrasound**. 446-479, 1998.
- [5] BALL, B.A. Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.11, p.650-665, 2008.
- [6] BECK,C.; CHARLES. J.A; MACLEAN, A, A. Ultrasound appearance of na equine testicular seminoma. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.42, n.4, p. 355-357, 2001.
- [7] PANIDS, D.; ROUSSO, D.; STERGIOPOULOS, K.; PAPATHANASIOU, K.; DELKOS, D.; PAPAESTSOS, M. The effect of testicular seminoma in semen quality. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. n.83, p. 219-222, 1999.
- [8] COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual Para Exame Andrológico de Sêmen Animal**. 3 ed. Belo Horizonte. 2013.

A recentrifugação do sobrenadante permite aumentar a recuperação de espermatozoides equinos destinados à criopreservação?

Karoline Maria Gil Braz¹

Marcelo Augusto Macedo Pinto²

Gustavo Mendes Gomes²

Leticia Patrão de Macedo Gomes²

Kleber da Cunha Peixoto Jr.¹

André Maciel Crespilho^{1,2}

E-mail: andremacc@yahoo.com.br

Abstract: This study tested the hypothesis of through centrifugation (CE) of the supernatant generated from equine semen cryopreservation protocols is possible to recover an additional numbers of viable sperm cells able to freeze. For the study 8 stallions had the ejaculates (n=10) collected, diluted (1:1) and submitted to centrifugation at 600 x g;10 min. After the CE, the sperm cells were recovered, and the supernatant was centrifuged again. The spermatozoa recovered on first (G1) or second (G2) CE were resuspended in cryopreservation extender and frozen. After thaw the samples were analyzed by CASA, morphology and plasmatic membrane integrity (IMP). The 2nd CE allowed the recuperation of $355 \times 10^6 (\pm 40.2)$ sperms. There were not observed differences for rapid cells, major and total defects and for IMP, respectively comparing G1 and G2. In conclusion, with the recentrifugation of the supernatant is possible to recover viable sperm, that didn't suffer additional effects associated to a second CE.

Keywords: centrifugation; equine; semen.

Palavras-chave: centrifugação; equino; sêmen.

Introdução - O uso do sêmen equino congelado possibilitou grandes avanços na área de reprodução animal, minimizando a transmissão de doenças infecciosas, quebrando barreiras geográficas e permitindo a otimização de ganhos zootecnicamente superiores, mesmo fora da estação reprodutiva. A etapa de centrifugação (CE) é essencial para o processo de criopreservação do sêmen equino, permitindo concentrar a fração espermática e promover a separação de boa parte do plasma seminal (PS) do ejaculado, trazendo benefícios sobretudo para ganhos que produzem espermatozoides com reduzida motilidade progressiva [1]. No entanto, estudos anteriores demonstraram que durante o processo de CE até 20% dos espermatozoides de uma amostra podem ficar retidos no sobrenadante, sendo integralmente descartados [2]. Reconhecendo o desperdício de material genético associado a retenção residual de células no sobrenadante da centrifugação, o objetivo do estudo foi avaliar se a recentrifu-

¹ Universidade Santo Amaro – UNISA

² Universidade Severino Sombra – USS

gação do sobrenadante permite a recuperação de espermatozoides viáveis, passíveis de serem criopreservados, o que potencialmente pode melhorar o aproveitamento biotecnológico do sêmen equino.

Material e Métodos - Foram utilizados oito garanhões da raça Mangalarga Marchador, em atividade reprodutiva e com histórico comprovado de fertilidade em estações de monta anteriores. Amostras seminais (n=10 ejaculados) foram coletadas por meio de vagina artificial modelo Botucatu, preenchida com água a 42°C, realizando-se a estimulação dos garanhões através de manequim artificial. Os ejaculados obtidos foram depositados em tubos plásticos de 50 mL. À cada amostra foi adicionado (proporção de 1:1) diluente BotuSemen Special® (Botupharma, Botucatu, Brasil) pré-aquecido a 37°C. Após a diluição foi realizada análise subjetiva de motilidade (%), vigor (escala de 1 a 5) e concentração espermática (diluição de alíquota de sêmen na proporção de 1:20 em água e contagem em câmara de Neubauer) em microscopia de luz (400x). As amostras foram submetidas a CE (Excelsa® Baby II, modelo 206-BL) sob velocidade de 600 x g; 10 min. Após o término da CE foi removido o sobrenadante e acondicionado em tubos de 50 mL, enquanto o pellet de espermatozoides concentrado na porção cônica do tubo foi ressuspendido em meio BotuCrio® (Botupharma, Botucatu, Brasil) para criopreservação (G1). O sobrenadante foi novamente centrifugado utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, recebendo ao final do procedimento o mesmo meio diluidor de criopreservação (G2). As amostras dos dois grupos experimentais foram transferidas para refrigerador digital (Minitube®, Tiefenbach, Alemanha) programado a 5°C onde permaneceram por 20 minutos. A congelação foi realizada em caixa isotérmica de 42 L previamente preenchida com 3,5 cm de coluna líquida de nitrogênio líquido (N2). Para essa etapa as palhetas de sêmen foram dispostas em raques horizontais que permaneceram a 6 cm do nível do N2 durante 20 minutos. Após este período, as amostras foram criopreservadas por imersão direta no N2 e armazenadas em botijão criobiológico. Para avaliação do sêmen as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C/30 segundos. Após a descongelação a cinética espermática foi avaliada através de sistema computadorizado (ISAS® V.1.2 Proiser®, Valencia, Espanha). Os parâmetros de avaliação empregados no estudo foram a motilidade espermática total (MT) e progressiva (MP); espermatozoides exibindo movimento rápido (RAP, %). Adicionalmente foram consideradas a MT e MP pós teste de termorresistência lento (MT-TTR; PROG-TTR respectivamente) à 37°C/ 60 minutos. Para cada amostra foram observados 5 campos aleatórios em câmara de análise modelo Sperm Tracker® (Proiser®, Valencia, Espanha), avaliando-se um número mínimo de 400 células por campo. Para avaliação morfológica alíquotas de 100 µL de sêmen foram depositadas em frascos graduados de 1,5 mL contendo solução formol salino a 2% acrescida de 20 µL de solução de eosina a 1%. À partir da contagem de 200 células em microscopia de contraste de fase foram determinados os percentuais de defeitos espermáticos maiores (DM) e totais (DT) de cada amostra. Para avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP) foi utilizada a combinação de sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (PI). Para tanto, alíquotas de 20 µL de sêmen de cada amostra experimental foram diluídas em 40 µL de solução de citrato de sódio 2,94% previamente aquecido a 37°C. À solução originada foi adicionado 50 µL de solução de trabalho fluorescente, composta

por 1,0 mL de citrato de sódio 2,94%, 20 µL de formol salino tamponado (solução de 2 mL de Formalina 38% em 98 mL de Ringer com Lactato de Sódio), 60 µL de PI e 20 µL de CFDA. Nessa etapa foram contabilizadas 200 células entre lâmina e lamínula de vidro em microscopia de epifluorescência, permitindo a diferenciação de espermatozoides portadores de membrana plasmática íntegra ou desestruturada. Os dados gerados foram avaliados através de modelo linear geral de análise de variância (GLM®, SAS Institute, Cary, USA). Diferenças foram consideradas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão - O número médio de células espermáticas recuperadas a partir da 2ª CE foi de $355 \pm 40,2 \times 10^6$ espermatozoides (mínimo de 110×10^6 e máximo de 480×10^6 células espermáticas), sendo que em média a concentração inicial dos 10 ejaculados coletados foi de $3,38 \times 10^9$ espermatozoides. A grande maioria dos protocolos destinados à criopreservação do sêmen equino invariavelmente envolvem alguma etapa de CE, mesmo reconhecendo que dependendo do tempo e da força de rotação, tal procedimento pode resultar em quedas significativas na qualidade e na fertilidade espermática [1]. Além disso, embora a CE promova a concentração espermática permitindo a eliminação de grande parte do PS, o procedimento pode interferir na taxa de recuperação espermatozoides em amostras destinadas à criopreservação. Nesse contexto, Ramires Neto et al. [2] observaram que até 20% dos espermatozoides presentes em um ejaculado equino podem ficar retidos na solução sobrenadante após a realização do processo de CE, gerando desperdícios de material genético que potencialmente poderia ser criopreservado. Resultados semelhantes também foram obtidos em nosso trabalho, considerando que em média 10,86% (355 milhões de células) dos espermatozoides originalmente presentes nos ejaculados foram recuperados e criopreservados após a recentrifugação do sobrenadante. Se considerado que a dose inseminante (DI) preconizada para obtenção de taxas de concepção aceitáveis com sêmen equino criopreservado é de 500×10^6 espermatozoides [3], é possível concluir que com a recentrifugação do sobrenadante foi possível recuperar cerca de 70% de uma DI de sêmen equino congelado, resultados que podem ser decisivos sobretudo para otimizar a utilização de ganhões naturalmente oligospermicos ou que apresentam baixa tolerância ao processo de criopreservação. Nesse contexto, a recentrifugação do sobrenadante possui alto potencial de implementação sobretudo para a raça de animais utilizados na pesquisa. De acordo com Furst [4] e Gomes e Gomes [5] ganhões Mangalarga Marchador naturalmente possuem menor produção espermática e podem ser considerados como produtores de sêmen com menor congelabilidade em relação a outras raças criadas no país.

Não foram observadas diferenças para o percentual de RAP ($11,5 \pm 2,10$ e $17,0 \pm 3,46$; $p=0,0645$), na MOT-TTR ($23,0 \pm 5,87$ e $16,5 \pm 4,85$; $p=0,1310$), no percentual de DM ($18,6 \pm 2,11$ e $17,2 \pm 1,6$; $p=0,2942$) e DT ($24,2 \pm 1,74$ e $22,8 \pm 1,97$; $p=0,2987$) comparando-se amostras espermáticas criopreservadas a partir da 1ª ou 2ª CE, respectivamente. No entanto a MP e a MP-TTR foram superiores para as amostras do G2 em relação ao G1 ($20,6 \pm 2,85^A$ e $13,1 \pm 1,29^B$; $p=0,0240$; $7,6 \pm 3,84^A$ e $4,4 \pm 1,39^B$; $p=0,0167$), respectivamente. Embora a MT tenha sido superior para o sêmen da 1ª CE quando comparado ao G2 ($43,5 \pm 3,72^A$ e $32,3 \pm 3,53^B$; $p=0,0106$; respectivamente), estudos anteriores tem demonstrado que a MP e

MP-TTR possuem maior correlação com potencial de fertilidade espermático em relação à avaliação de movimento total [6], explicando com maior acurácia as possíveis variações nos índices de concepção *in vivo* apresentadas por diferentes partidas de sêmen.

Apesar de estudos anteriores demonstrarem que a CE pode promover aumento significativo na liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) gerados a partir de espermatozoides mortos, leucócitos e debris celulares em suspensão, havia a expectativa de que a recentrifugação do sobrenadante pudesse acarretar maior ocorrência de injúrias morfológicas e estruturais aos espermatozoides criopreservados a partir da 2ª centrifugação. No entanto, não foram observadas diferenças ($p=0,2575$) para a IMP do G1 ($43,1 \pm 3,09$) em relação ao G2 ($41,0 \pm 2,30$), demonstrando que a recentrifugação não resulta em insultos adicionais à membrana plasmática dos espermatozoides equinos.

Considerações Finais - À partir do processo de recentrifugação do sobrenadante é possível a recuperação de um número significativo de espermatozoides viáveis, passíveis de serem criopreservados para utilização em programas reprodutivos. Adicionalmente, de acordo com a metodologia experimental proposta não foram observados efeitos deletérios adicionais associados à recentrifugação, demonstrando que, de acordo com os parâmetros cinéticos e estruturais pesquisados, a técnica representa uma alternativa para otimização do sêmen equino criopreservado.

Referências Bibliográficas

- [1] Gib Z, Aikten JR. Recent Developments in stallion semen preservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2016;43(Supl):29-36.
- [2] Ramires Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'aqua JA JR, Papa FO, Castro-Chaves MM, Alvarenga MA. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, 2013;79(7):1120-23.
- [3] Brinsko SP. Insemination doses: how low can we go? **Theriogenology**, 2005;66(3):443-50.
- [4] Barrier Battut I, 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;97:186-00.
- [5] Furst R. Efeito de diferentes tempo de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. Tese de Doutorado.
- [6] Gomes GM, Gomes LPM. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 2009;6(Supl):210-15.

Biometria de glândulas genitais acessórias em touros jovens Nelore, Caracu e Senepol

Naiara Nantes Rodrigues¹
naiara_nantes@hotmail.com

Guilherme Fazan Rossi¹

André Lasmar Guimarães²

Dayane Priscila Vrisman¹

Renata Chichitosti Dal Bem¹

Anielly de Paula Freitas³

Fabio Morato Monteiro²

Maria Emilia Franco Oliveira¹
m_emiliafraoli@yahoo.com.br

Abstract: The aim of the present study was to characterize and compare biometrics of the accessory sex glands in Nelore, Caracu and Senepol bulls. Two hundred and twenty-five animals were used (Nelore, n=137, Caracu, n=43, Senepol, n=45), aged between 12 and 16 months. Data were analyzed by the GLM procedure of the SAS® program ($p < 0.05$). The biometry of vesicular glands, ampullae of vas deferens, ampulla lumen, disseminated prostate and bulbourethral glands were superior in Caracu bulls when compared to Nelore ones. The Senepol bulls presented smaller vesicular glands when compared to Caracu bulls and higher in relation to Nelore ones. There was a difference between Senepol and Nelore bulls in ampules of vas deferens, body of prostate (dorsoventral) and in dorsoventral measurement of the bulbourethral glands. The Caracu bulls presented largest bulbourethral glands (craniocaudal) than Senepol bulls. In conclusion, biometric characteristics of accessory sex glands are influenced by genetic group.

Keywords: andrological; bovine; ultrasonography

Palavras-chave: andrológico; bovinos; ultrassonografia

Introdução - O exame andrológico em bovinos é de extrema importância para identificação da capacidade reprodutiva dos touros, proporcionando selecionar animais com bom potencial a reprodução (ALFARO, 2011). A avaliação das glândulas genitais acessórias é uma das etapas do exame andrológico, no entanto, muitas vezes negligenciadas. A ultrassonografia é uma ferramenta diagnóstica que proporciona a investigação mais precisa da integridade dos órgãos e o acompanhamento de transformações relacionadas ao desenvolvimento dos órgãos (CAMELA et al., 2017). Embora a ultrassonografia seja uma ferramenta de grande potencial na andrologia veterinária, especialmente para avaliação dos órgãos reprodutivos internos,

¹ FCAV-UNESP

² Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia

³ Faculdade de Medicina de Ribeirão – USP

ainda é pouco empregada. Acredita-se que a ampliação do uso desta ferramenta na avaliação das glândulas genitais acessórias seria possível a partir da caracterização ultrassonográfica destes órgãos em suas condições normais (WEBER et al., 1988), auxiliando técnicos a complementar a avaliação andrológica e como consequência interferindo positivamente sobre a eficiência reprodutiva dos rebanhos. Portanto, o objetivo do estudo foi caracterizar e comparar parâmetros biométricos das glândulas genitais acessórias em touros jovens das raças Nelore, Caracu e Senepol.

Material e Métodos - O trabalho foi realizado no Instituto de Zootecnia, localizado no município de Sertãozinho, SP, no período de outubro de 2016 a janeiro de 2017. Os animais foram mantidos em pastagem composta por capins do gênero *Brachiaria*, com sal mineral e água *ad libitum*. Foram utilizados 225 bovinos machos jovens das raças Nelore ($n=137$, 13,64 \pm 0,07 meses de idade, e 339,01 \pm 4,80 kg de peso vivo), Caracu ($n=43$, 13,76 \pm 0,11 meses, e 386,11 \pm 6,25 kg) e Senepol ($n=45$, 14,66 \pm 0,14 meses, e 478,20 \pm 8,70 kg). Avaliações ultrassonográficas modo-B foram realizadas utilizando equipamento ultrassonográfico portátil (Mindray Z5[®], Shenzhen, China) com transdutor transretal linear (7,5 MHz). A biometria das glândulas genitais acessórias (glândulas vesiculares, ampolas dos ductos deferentes, próstata e glândulas bulbouretrais) foi realizada no próprio aparelho ultrassonográfico. As glândulas vesiculares foram medidas na dimensão dorsoventral em três pontos (cranial, médio e caudal) e calculada a média, assim como a porção disseminada da próstata e as ampolas do ducto deferente, porém nesta última também foi calculada a dimensão do lúmen, quando presente. Os tamanhos do corpo da próstata e das glândulas bulbouretrais foram calculados nas dimensões dorsoventral e craniocaudal. Para todas as medidas de estruturas pares foram calculadas as médias. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o método dos quadrados mínimos, por meio do procedimento GLM do programa estatístico SAS[®], e o nível de significância adotado pelo teste de Tukey foi de 5%. No modelo foi incluído o efeito fixo de raça e idade como covariável.

Resultados e Discussão - As glândulas vesiculares são lobuladas e irregulares em ruminantes, e contém vesículas com líquido ao longo do tecido (CAMELA et al., 2017). No presente estudo elas se apresentaram dorsolaterais à vesícula urinária e cranial à próstata, e sua medida foi menor nos touros Nelore em relação aos Caracu e Senepol (Tabela 1). O achado parece ser justificado pelo fato dos animais Nelore (*Bos indicus*) serem sexualmente mais tardios que animais Caracu e Senepol (*Bos taurus*). Os animais mais precoces possivelmente já estavam produzindo maior quantidade de andrógenos, fator determinante para a taxa de crescimento da glândula (ROCHA et al., 1994). Em posição medial no vértice interno do ângulo formado pelas glândulas vesiculares (WEBER et al., 1988), foi possível identificar as ampolas do ducto deferente, de formato longilíneo, as quais têm função de armazenamento de espermatozoides antes da ejaculação, e contribuem com a produção de líquido para formação do sêmen (WEBER et al., 1988). As ampolas foram maiores em touros Caracu e Senepol, quando comparado com Nelore. Foi observado no interior das ampolas a presença de lúmen anecóico em 25 animais Nelore (18,24%), 23 Caracu (53,48%) e 21 Senepol (46,66%). Os touros Caracu

apresentaram o lúmen das ampolas com medida superior aos Nelore, enquanto os Senepol apresentaram esta dimensão similar a ambos. A não identificação do lúmen em todos os animais do estudo pode estar relacionado tanto a diferenças no desenvolvimento sexual entre as raças, quanto a ejaculação recente, em função do comportamento de sodomia dos touros (MIRANDA NETO et al., 2011).

Tabela 1. Média \pm SEM da biometriaa das glândulas genitais acessórias de touros jovens das raças Nelore, Caracu e Senepol, realizadas no aparelho ultrassonográfico (Mindray Z5⁺, Shenzhen, China) com transdutor transretal linear (7,5 MHz).

| Variáveis | Raças | | | p |
|----------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| | Nelore | Caracu | Senepol | |
| Glândula vesicular | | | | |
| Dorsoventral (cm) | 1,00 \pm 0,01 ^c | 1,39 \pm 0,03 ^a | 1,24 \pm 0,03 ^b | 0,0001* |
| Ampola do ducto deferente | | | | |
| Dorsoventral (cm) | 0,41 \pm 0,01 ^b | 0,66 \pm 0,01 ^a | 0,63 \pm 0,01 ^a | 0,0001* |
| Lúmen da ampola | | | | |
| Dorsoventral (cm) | 0,16 \pm 0,01 ^b | 0,21 \pm 0,01 ^a | 0,17 \pm 0,01 ^{ab} | 0,0373* |
| Corpo da próstata | | | | |
| Dorsoventral (cm) | 0,76 \pm 0,01 ^b | 0,75 \pm 0,02 ^b | 0,85 \pm 0,02 ^a | 0,0108* |
| Craniocaudal (cm) | 0,83 \pm 0,01 | 0,81 \pm 0,02 | 0,81 \pm 0,02 | 0,7867 |
| Próstata disseminada | | | | |
| Dorsoventral (cm) | 1,03 \pm 0,01 ^b | 1,13 \pm 0,02 ^a | 1,05 \pm 0,03 ^{ab} | 0,0135* |
| Bulbouretral | | | | |
| Craniocaudal (cm) | 1,43 \pm 0,02 ^b | 1,67 \pm 0,04 ^a | 1,45 \pm 0,04 ^b | 0,0001* |
| Dorsoventral (cm) | 1,14 \pm 0,02 ^b | 1,44 \pm 0,03 ^a | 1,33 \pm 0,03 ^a | 0,0001* |

Letras indicam diferenças entre raças. *p < 0,05

A próstata de bovinos é composta por duas porções, corpo e porção disseminada. No presente estudo, a medida dorsoventral do corpo da próstata foi superior na raça Senepol, quando comparado aos demais. Já a medida craniocaudal desta porção da próstata não diferiu entre as raças. Possivelmente a diferença em apenas uma dessas medidas está relacionada a um formato diferente deste órgão em animais Senepol. A porção disseminada, encontrada ao longo da uretra pélvica (CAMELA et al., 2017), foi maior em Caracu em relação aos Nelore. O achado parece reforçar a diferença no desenvolvimento sexual entre estas raças, uma vez que a taxa de crescimento deste órgão é andrógeno dependente, sendo a di-hidrotestosterona o andrógeno primário da próstata (CHANDOLIA et al., 1997).

As glândulas bulbouretrais foram localizadas caudalmente à vesícula urinária e apresentaram formato variando entre ovóide a oval achatada, devido a contrações rítmicas do músculo bulboesponjoso (WEBER et al., 1988). Tanto a medida craniocaudal como a medida dorsoventral desta glândula foram superiores nos touros Caracu em relação aos Nelore. A

medida dorsoventral desta glândula em touros Senepol foi semelhante aos Caracu e ambos superior aos Nelore, o que parece ser explicado mais uma vez pelas diferenças no desenvolvimento e precocidade sexual de animais *Bos taurus*. Estes provavelmente estavam com a função de produção de fluido da glândula mais avançada em relação aos animais Nelore.

Considerações Finais - A biometria das glândulas genitais acessórias de touros jovens das raças Nelore, Caracu e Senepol foram caracterizadas. Características biométricas das glândulas genitais acessórias sofrem influência do grupo genético (raças). Além disso, a ultrasonografia é útil para medir e avaliar os órgãos do sistema reprodutor masculino e analisar o estágio do desenvolvimento reprodutivo de touros.

Referências Bibliográficas

- [1] Alfaro, C.E.P. Importância da avaliação andrológica na seleção de reprodutores a campo. **Rev. Bras. de Reprod. Anim.**, v.35, n.2, p.152-153,2011.
- [2] Camela, E. S. C.; Nociti, R. P.; Santos, V. J. C.; Macente, B. I.; Maciel, G. S.; Feliciano, M. A. R.; Vicente, W. R. R.; Gill, I.; Bartlewski, P. M.; Oliveira, M. E. F. Ultrasonographic characteristics of accessory sex glands and spectral Doppler indices of the internal iliac arteries in peri- and post-pubertal Dorper rams raised in a subtropical climate. **Anim. Reprod. Science**, v. 184, p. 29–35, 2017.
- [3] Weber, J.A.; Hilt, C.J.; Woods, G.L. Ultrasonographic appearance of bull accessory sex glands. **Theriogenology**, v.29, n.6, p. 1347-1355, 1988.
- [4] Rocha, A.; Carpenter, B.B.; Hawkins, H.E.; Sprott, L.R.; Forrest, D.W. Correlation of in vivo testicle and seminal vesicle size with post mortem dimensions in bulls. **Theriogenology**, v. 42, p. 1171–1176, 1994.
- [5] Miranda Neto, T.; De Castilho, E. F.; Pinho, R. O.; Guimarães, S. E. F.; Da Costa, E. P.; Guimarães, J. D. Puberdade e maturidade sexual em touros jovens da raça Simental, criados sob regime extensivo em clima tropical. **Rev. Bras. Zoot.**, v. 40, n. 9, p. 1917–1925, 2011.
- [6] Chandolia, R. K.; Honaramooz, A.; Omeke, B. C.; Pierson, R.; Beard, A. P.; Rawlings, N. C. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v. 48, n. 1, p. 119–132, 1997.

Agradecimentos: A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida a primeira autora.

Efeito da Coenzima Q-10 sobre a qualidade do sêmen criopreservado de garanhões *bad* e *good freezers*

Renata Lançoni¹
renata.lanconi@usp.br

Eneiva Carla Carvalho Celeghini²
Carla Patricia Teodoro de Carvalho¹

Gabriela Bertaiolli Zoca¹

Laura Nataly Garcia-Oliveros²

Leonardo Batissaco²

Rubens Paes de Arruda^{1*}
arrudarp@usp.br

Abstract: This work aims to evaluate the effect of CoQ-10 on equine semen post-thawing. For this, 8 stallions were used separates in 2 groups, *bad freezers* (n=4) and *good freezers* (n=4). Five ejaculates of each stallions were collected (n=40) and after were submitted to cryopreservation in 3 treatments – control (BotuCrio[®]); 1 mM de CoQ-10 and 50 µM de CoQ-10. After thawing the semen was analyzed for the parameters of sperm motility and progressive motility by the CASA system and for the mitochondrial functionality by the cytochemical technique based on the oxidation of 3,3 diaminobenzidine by the cytochrome C complex. The analyzes showed that there was no interaction effect of quality and treatments, but there were effect of treatments. So, it can be concluded that equine cryopreserved semen with 1 mM CoQ-10 presented better mitochondrial functionality when compared to the control group.

Keywords: antioxidants; cryopreservation; equine semen.

Palavras-chave: antioxidantes; criopreservação; sêmen equino.

Introdução - Embora possamos notar que houve evolução na técnica de criopreservação de sêmen em equinos, principalmente com o desenvolvimento de novos diluidores, as taxas de concepção ainda são menores quando comparadas com monta natural, sêmen *in natura* diluído ou refrigerado [1]. Uma limitação do sêmen congelado equino é devido à alta variabilidade entre garanhões com relação à capacidade espermática de sobreviver à criopreservação. Devido a individualidade dos garanhões, pode-se classificá-los em duas categorias, os que possuem espermatozoides que resistem bem ao processo de criopreservação, ou seja, apresentam boa congelabilidade (*good freezers*) e os que possuem espermatozoides que não suportam os processos pelo qual as células precisam ser submetidas durante a congelamento,

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.

ou seja, apresentam baixa congelabilidade (*bad freezers*). Isso significa que a técnica ainda demanda outros estudos para que seja possível o entendimento dos processos que ocorrem, para que se possa melhorar o sêmen pós descongelação e, principalmente, as taxas de concepção. A Coenzima Q-10 (CoQ-10) está envolvida na cadeia respiratória mitocondrial que consiste em uma série de carregadores que agem sequencialmente, sendo a maioria deles proteínas integrais em grupos prostéticos capazes de aceitar e doar um ou dois elétrons. Portanto, a CoQ-10 desempenha um papel muito importante na produção de energia celular atuando na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (cadeia respiratória), sendo assim essencial para a produção de energia em forma de ATP [2]. Além de sua atuação como transportadora de elétrons e prótons na mitocôndria, sua forma reduzida (ubiquinol) exerce um papel de potente antioxidante lipofílico e é capaz de “reciclar” e “regenerar” outros antioxidantes como tocoferol e ascorbato [3]. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a ação da CoQ-10 nos espermatozoides criopreservados de ganhões *bad* e *good freezers*.

Material e Métodos - Os ganhões foram previamente separados em 2 grupos baseados na sua congelabilidade: *bad freezers* (n=4) e *good freezers* (n=4). O grupo *bad* era composto por ganhões que apresentavam mais de 90% de seus ejaculados com motilidade progressiva menor que 40% e o grupo *good* era composto por ganhões que possuíam mais de 90% dos seus ejaculados com motilidade progressiva maior que 50% pós-descongelação. Em seguida, foram feitas 5 colheitas de cada ganhão (n=40). Logo após a colheita, o sêmen foi filtrado para a separação da parte gelatinosa da parte rica em espermatozoides para posterior leitura do volume do ejaculado. A seguir, o sêmen foi diluído na proporção de 1 parte de sêmen para 1 parte de diluidor a base de leite desnatado (Maxsêmen[®], Rancho das Américas, Porto Feliz, SP, Brasil). Após 5 minutos da diluição, foram observados de maneira subjetiva a motilidade e o vigor espermáticos. Posteriormente, o sêmen foi dividido em tubos de 15 mL e submetido a centrifugação a 500 x g durante 12 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, os tratamentos foram adicionados e a concentração espermática ajustada para 200x10⁶ espermatozoides/mL. Cada ejaculado foi separado em 3 tratamentos: controle (diluidor de congelamento BotuCrio[®] - Botupharma, Botucatu, SP, Brasil); 1 mM de CoQ-10 e 50 µM de CoQ-10 (adicionada nas respectivas concentrações ao mesmo diluidor utilizado no tratamento controle). Em seguida, o sêmen foi criopreservado em sistema automatizado TK 3000[®] e analisado pós-descongelação. As variáveis analisadas foram motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (MOTPR) pelo sistema CASA (HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA), além de funcionalidade mitocondrial pela técnica citoquímica baseada na oxidação da 3,3 diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, em uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria [4]. Para a realização desta técnica, uma amostra de 25 µL de sêmen foi incubada com 25 µL DAB (1 mg/mL de PBS) a 37°C durante 1 hora. Em seguida, foram feitos esfregaços em lâminas de vidro e estes, foram fixados em formol durante 10 minutos. As lâminas foram secas ao abrigo da luz. A seguir foram contados 200 espermatozoides por amostra e classificados em 4 categorias: DAB 1- espermatozoides com peça intermediária totalmente corada, com praticamente todas as

mitocôndrias ativas, indicando alta atividade mitocondrial; DAB 2- espermatozoides com mais da metade das mitocôndrias coradas, indicando atividade mitocondrial média a alta; DAB 3- espermatozoides com menos da metade das mitocôndrias coradas, indicando baixa atividade mitocondrial e DAB 4- espermatozoides com peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial [4]. Os dados foram analisados quanto a normalidade dos resíduos e comparações entre os tratamentos foram realizadas pelo procedimento MIXED do programa SAS (versão 9.3), as diferenças entre os tratamentos foram encontradas pelo Teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa quando $P \leq 0,05$.

Resultados e Discussão - Os resultados para as características de MOT e MOTPR foram semelhantes entre os tratamentos. As análises demonstram que não houve efeito de interação de qualidade (*bad* ou *good*) e tratamentos, porém houve efeito de tratamentos. A adição de 1 mM de CoQ-10 ao diluidor de congelação apresentou maior ($P < 0,05$) quantidade de células com alta funcionalidade mitocondrial - DAB 1 ($64,15 \pm 1,81$) do que o controle ($58,49 \pm 1,96$). Este fato indica que a CoQ-10 melhorou a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, ou seja, a funcionalidade mitocondrial. Estudos futuros poderiam demonstrar que isto pode ter influenciado em outros parâmetros celulares, como diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, menor lesão de membranas espermáticas além de possível melhora na fertilidade.

Conclusão - Com este estudo, podemos concluir que a adição de CoQ-10 na concentração de 1 mM ao diluidor de congelação melhora a funcionalidade mitocondrial do sêmen criopreservado de garanhões.

Referências Bibliográficas

- [1] Braford, L. L.; Buhr, M. M. Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, p. 546-550, 2002.
- [2] Ernster, L.; Dallner, G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, v. 1271, n. 1, p. 195-204, 1995.
- [3] Sinatra, S. T.; Chopra, R. K.; Jankowitz, S.; Horohov, D. W.; Bhagavan, H. N. Coenzyme Q10 in equine serum: response to supplementation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 2, p. 71-73, 2013.
- [4] Hrudka, F. cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

Agradecimentos: FAPESP (2016/14626-7); CAPES; Central internacional de Reprodução Equina Rancho das Américas.

Avaliação do sêmen bovino: quais parâmetros possuem relação com as taxas de concepção de vacas submetidas à IATF?

Augusto Rodrigues Felisbino Neto¹

Lorenzo Garrido Sagabinazzi²

Kleber da Cunha Peixoto Jr.³

Karoline Maria Gil Braz³

Gustavo Mendes Gomes⁴

André Maciel Crespilho^{3,4}

andremacc@yahoo.com.br; acrespilho@prof.unisa.br

Abstract: In this study were used retrospective data from 1805 fixed-time artificial inseminations (FTAI) in beef cattle. All cows were inseminated with frozen semen from 11 Aberdeen Angus bulls. After thawed all semen samples were analyzed for sperm kinetics and concentration (CASA), thermoresistance test (TTR), sperm morphology and plasma membrane integrity (IMP). No differences were observed between the different categories of major defects (15% <or ≥15%), total defects (20% < or ≥30%) and IMP (40%< or ≥40%) on conception rates. Samples with ≤50% of total motility (TM) showed a similar conception rate compared to semen doses with >50% of MT. However, higher pregnancy rates were associated with semen samples with higher progressive motility (MP, p=0.0235), sperm concentration (p=0.0205), and MP post-TTR (p=0.0496). It is concluded that different sperm parameters evaluated *in vitro* have a diverse impact on *in vivo* conception rates, which can be positively influenced by more concentrated samples and more PM.

Keywords: bull; insemination; pregnancy.

Palavras-chave: inseminação, prenhez; touro.

Introdução - Embora muitos avanços tenham ocorrido nos últimos anos relacionados ao desenvolvimento de protocolos hormonais cada vez mais efetivos para sincronização do estro e ovulação de fêmeas bovinas destinadas a inseminação artificial em tempo-fixo (IATF), a qualidade do sêmen empregado nos programas ainda desperta preocupação e merece especial atenção de veterinários e pecuaristas. De acordo com Celeghini et al. [1] existe uma grande variação (não apenas no âmbito da qualidade, como também em termos de fertilidade) entre partidas de sêmen de diferentes touros ou mesmo quando comparadas amostras produzidas a partir do ejaculado do mesmo reprodutor, que pode levar a oscilações nos índices de fertilidade animal, comprometendo a produtividade e a lucratividade da exploração pecuária.

¹ Ouro Fino Saúde Animal*

² Universidade Estadual Paulista, UNESP

³ Universidade Santo Amaro, UNISA

⁴ Universidade Severino Sombra, USS

Atualmente técnicas mais precisas de avaliação espermática têm sido desenvolvidas e incorporadas na rotina de análise de sêmen animal. No entanto, a correlação entre os diferentes parâmetros espermáticos avaliados *in vitro* e os índices de fertilidade *in vivo* permanecem variáveis [2] e por muitas vezes imprevisíveis, dificultando a interpretação e seleção de partidas de sêmen para uso em trabalhos de IATF. Tendo em vista a importância e impacto do sêmen para os programas de IATF o objetivo do estudo foi verificar a associação entre os resultados de diferentes parâmetros cinéticos avaliados pós-descongelação e pós incubação, além da morfologia e integridade de membrana plasmática com os índices de concepção de vacas de corte submetidas à IATF.

Material e Métodos - Para o estudo foram utilizados dados retrospectivos de 1805 IATFs conduzidas em 5 fazendas situadas no Estado de Mato Grosso, Brasil (Latitude: 15°53'24" S; Longitude: 52° 15'24" W) utilizando vacas multíparas zebuínas. Todos os animais foram submetidos às mesmas condições de manejo e alimentação a pasto, recebendo sal mineral e acesso à água *ad libitum*. Após avaliação de escore de condição corporal (escala de 1 a 5) todas as vacas foram sincronizadas a partir de dispositivos intravaginais contendo 1 g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil), inseridos no primeiro dia do protocolo (D0) em associação à administração de 2 mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil). No dia 8 (D8) todas as vacas receberam aplicação em dose única de 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (Sincro eCG®, Ouro Fino, Brasil), 1 mg de cipionato de estradiol (SincroCP®, Ouro Fino, Brasil) e 0,5 mg de análogo de prostaglandina (SincroCio®, Ouro Fino, Brasil), juntamente com a retirada dos implantes. Todas as vacas foram inseminadas 48-54 horas após a remoção dos dispositivos com sêmen previamente analisado de 11 reprodutores Aberdeen Angus (31 partidas de sêmen). Amostras espermáticas de cada touro foram utilizadas para inseminação de um número mínimo de 70 e máximo de 423 vacas. O diagnóstico de gestação foi realizado ultrassonograficamente 30 a 60 dias após a IATF.

Análise Espermática e Modelo Estatístico - Para análise de qualidade as palhetas de sêmen foram descongeladas à 36°C/30s, homogeneizadas e acondicionadas em banho-maria seco a temperatura constante de 37°C. Adicionalmente, alíquotas de 50 µL de sêmen foram transferidas para tubos plásticos pré-aquecidos, incubados em banho-maria a 46°C/ 30 min para perfazer o teste de termorresistência (TTR) rápido. Amostras recém descongeladas ou pós-incubação foram analisadas quanto a motilidade total (MT) e progressiva (MP), linearidade espermática (LIN), percentual de células rápidas (RAP) e concentração de espermatozoides/dose através de sistema computadorizado de análise (CASA, ISAS®, Proiser, Valência, Espanha). Para avaliação morfológica, alíquotas de 100 µL de sêmen foram fixadas em 200 µL de solução formol salino a 2%, acrescido de 20 µL de eosina a 1%. A partir da contagem de 200 células em microscopia de contraste de fase (aumento de 1000x sob imersão) foram determinados os percentuais de defeitos espermáticos maiores (DM) e totais (DT) de cada amostra de sêmen bovino utilizada na IATF. Para avaliação da integridade de membrana plasmática (IMP) foi utilizada a combinação de sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína e Iodeto de Propídeo, de acordo com Crespilho et al. [3]. Para cada amostra foram contabiliza-

das 200 células entre lâmina e lamínula de vidro em microscopia de epifluorescência (400x), permitindo a diferenciação dos espermatozoides portadores de membrana íntegra.

Os dados gerados foram analisados através de regressão logística múltipla (Proc-Reg Procedure, SAS Institute, Cary, USA) e classificados para posterior análise através de modelo linear geral de análise de variância (GLM*, SAS Institute, Cary, USA), onde as variáveis seminais (independente de touro e partida de sêmen) foram consideradas independentes e a taxa de concepção na IATF como variável dependente ($P < 0,05$). Segundo o modelo estatístico proposto, para os dados categorizados foram consideradas as classes de motilidade total ($MT < 50\%$; $50\% \leq MT \leq 60\%$; $MT > 60\%$); progressiva ($MP \leq 15\%$; $MP > 15\%$); motilidade total pós-TTR ($MT-TTR \leq 15\%$; $MT-TTR > 15\%$); motilidade progressiva pós-TTR ($MP-TTR \leq 10\%$, $MP-TTR > 10\%$) e concentração espermática ($CONC \leq 15 \times 10^6$; $15 \times 10^6 < CONC \leq 20 \times 10^6$; $CONC > 20 \times 10^6$ espermatozoides/ palheta).

Resultados e Discussão - A taxa média de concepção foi de 46,81% (845/ 1805), não havendo diferenças nos índices de fertilidade quando comparadas as diferentes propriedades. Partidas com MOT pós-descongelamento abaixo de 50% alcançaram as mesmas taxas de concepção (47,91%; $n = 503$ inseminações) quando comparadas a amostras entre 50-60% (46,60%; $n = 1013$) e acima de 60% (45,68%; $n = 289$). No entanto, doses de sêmen com $MP > 15\%$ determinaram 47,45% de taxa de concepção na IATF, enquanto amostras com $MP \leq 15\%$ responderam por 35,71% dos diagnósticos positivos de gestação, sendo observada relação positiva e linear entre MP e as taxas de concepção na IATF ($p = 0,0235$). Tais resultados se assemelham aos reportados por Oliveira et al. [4] que concluíram que a motilidade progressiva representa um importante fator preditivo da fertilidade do sêmen bovino congelado.

Maiores taxas de prenhez na IATF foram associadas a doses de sêmen com maior motilidade total ($p = 0,0087$) e progressiva ($p = 0,0439$) pós-teste de termorresistência. Embora estudos anteriores tenham reportado baixas correlações entre motilidade pós-TTR e fertilidade do sêmen bovino [5], Oliveira et al. [4] destacaram que a MP avaliada objetivamente por CASA após a incubação de 2 horas representou um dos principais parâmetros de movimento a serem utilizados para estimativa do potencial de fertilidade *in vivo* de doses de sêmen bovino. Em outro estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa foram observados valores superiores de MT e MP pós-teste de termorresistência a $45^\circ\text{C}/ 30 \text{ min}$ para partidas de sêmen de diferentes reprodutores, que apresentaram grande variação ($p < 0,10$) quanto as taxas de concepção (55,55% vs 43,22%) na IATF [6], resultados que indicaram a aplicabilidade dos diferentes testes de incubação no contexto da seleção de partidas de sêmen bovino com maior potencial de fertilidade.

As doses de sêmen variaram entre $10,5 \times 10^6$ a $45,5 \times 10^6$ (média de $20,16 \pm 4,71 \times 10^6$ espermatozoides totais), sendo que maiores taxas de concepção também foram associadas às amostras que apresentaram maior concentração espermática ($p = 0,0058$). Tais resultados encontram-se em consonância aos reportados por Crespilho et al. [3] que observaram relação positiva e linear entre o aumento da dose inseminante e os índices de concepção de vacas submetidas à IATF. De acordo com os autores o aumento do número de espermatozoides

inseminados pode garantir maior quantidade de células espermáticas acessórias na tuba uterina, o que pode justificar o aumento das taxas de prenhez.

O percentual de defeitos espermáticos maiores ($p=0,6317$) ou totais ($p=0,1785$) não exerceu influência sobre a fertilidade do sêmen bovino utilizado para IATF. Mesmo reconhecendo que a qualidade do sêmen depende da integridade e função de todas as estruturas que compõem a célula espermática [1] todas as partidas de sêmen utilizadas em nosso estudo apresentaram baixas proporções de DM ($10,75 \pm 4,15\%$) ou DT ($18,82 \pm 7,21\%$), o que pode justificar os resultados encontrados. Conclusões semelhantes podem ser estabelecidas para a integridade de membrana plasmática, onde também não foram observadas relações positivas entre o aumento da IMP dos espermatozoides e os índices de concepção animal. Como todas as partidas de sêmen utilizadas apresentaram alto percentual de membranas íntegras ($38,05 \pm 6,95\%$) a variabilidade entre touros/ partidas quanto às taxas de concepção não pôde ser explicada baseado nesse parâmetro de qualidade espermática.

Considerações Finais - Conclui-se que os diferentes atributos de qualidade espermática avaliados *in vitro* impactam de maneira diversa nas taxas de concepção *in vivo*, que pode ser positivamente influenciada por amostras de sêmen bovino mais concentradas, mais resistentes aos testes de incubação e com maior progressividade de movimento.

Referências Bibliográficas

- [1] Celeghini ECC, Arruda RP, Florez-Rodriguez SA, Santos FB, Alves MBR, Oliveira BMM. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim.**, 2017;41(1):40-45.
- [2] Freitas-Dell'Aqua CP, Crespilho AM, Papa FO, Dell'Aqua Jr. JA. Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 2009;33(4):213-22.
- [3] Crespilho AM, Papa FO, Sá Filho MF, Guasti PN, Dell'Aqua Jr JA, Vasconcelos JLM, Novaes JLC, Martins Jr. A. The influence of insemination dose on pregnancy per fixed-time artificial insemination in beef cows is affected by semen extender. **Anim Reprod.**, 2014;11(1):3-10.
- [4] Oliveira LZ, Ribeiro LB, Silva LGT, Oliveira CS, Dias EAR; Campanholi SP, Campos CC, Oliveira MV, Monteiro FM. Assessment of different *in vitro* sperm challenges and *in vivo* fertility of bovine semen batches. **Braz. J Vet Res Anim Sci.**, 2017;54(3):264-76.
- [5] Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. **Anim Reprod Sci.**, 2009;113(1-4):279-82.
- [6] Oliveira LZ, Santos RM, Arruda R P, Andrade AFC, Peres RFG, Martins, JPN, Reeb PD, Monteiro FM, Beletti ME, Hossepian de Lima VFM. Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Anim Reprod Sci.**, 2013;137(3-4):145-55.

Agradecimentos – Ouro Fino Saúde Animal®, Cravinhos, SP, Brasil; VetSemen® – Análise de sêmen para inseminação artificial, Barueri, SP, Brasil.

Taxas de prenhez em função de características reprodutivas de diferentes linhagens de touros Canchim

Narian Romanello¹
narian.r._@hotmail.com

Alexandre Rossetto Garcia²
alexandre.garcia@embrapa.br

Cintia Righetti Marcondes²

André de Faria Pedroso²

Sérgio Novita Esteves²

Verônica Schinaider do Amaral Pereira²

Daniela Botta³

Andréa do Nascimento Barreto³

Marco Antonio de Paula Sousa³

Alessandro Giro³

Abstract: The aim of the present study was to evaluate pregnancy rates and reproductive characteristics of three different lineages: Antiga (A), Nova (N) and Cruzada (C) of Canchim bulls. The bulls (n=27; 52.0±2.7 months; 674.7±18.6 kg) were kept on pasture, from 2014 to 2017, comprising the breeding seasons. Prior to entry in the breeding season, the bulls underwent breeding soundness evaluation. Bulls were annually challenged to mount an average of 40 Canchim cows (n=990). In order to evaluate the pregnancy rate, the cows were submitted to transrectal ultrasonography at the end of the season. After andrological evaluation, each bull was classified as Superior or Intermediary, according its seminal quality. Animals of the N and C lineages had higher pregnancy rates (P<0.05). Bulls classified as Superiors presented higher pregnancy rates, compared to the data of the population evaluated (P<0.05).

Keywords: bovine; breeding season; fertility.

Palavras-chave: bovinos; estação de monta; fertilidade.

Introdução - A raça Canchim teve sua primeira formação na década de 50, sendo fixada como a melhor combinação 5/8 Charolês x 3/8 Zebu, primordialmente baseada no uso de vacas Indubrasil. Essa primeira formação originou uma linhagem atualmente conhecida como Linhagem Antiga (A). Posteriormente, na década de 90, nova metodologia de formação foi adotada, com base no uso de matrizes Nelore inseminadas com sêmen importado da França, o que deu origem à Linhagem Nova (N). Mais recentemente, do cruzamento dessas linhagens, foi originada a Linhagem Cruzada (C). Tanto no Canchim como nas demais raças,

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP

² Embrapa Pecuária Sudeste

³ Universidade Federal do Pará

diversos parâmetros reprodutivos podem ser considerados relevantes para os programas de melhoramento genético. O uso de informações sobre esses parâmetros pode auxiliar na seleção de touros mais produtivos e funcionais, principalmente quando os touros são usados em sistemas de monta a campo em regiões tropicais. Dentre eles, destacam-se o comportamento reprodutivo, a libido, a capacidade de monta e, por fim, a qualidade seminal¹. Apesar desses elementos serem passíveis de avaliação quantitativa, nenhum deles faz parte da composição de índices de classificação sistemática de touros, em geral restritas ao desempenho zootécnico e à biometria escrotal. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis diferenças nas características seminais de touros Canchim das Linhagens Antiga (A), Nova (N) e Cruzada (C) e sua fertilidade a campo em regime de monta natural.

Material e Métodos - O experimento foi realizado durante as estações de monta de 2014 a 2017, na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos-SP, Brasil. No período, foram utilizados 27 touros Canchim (52,0±2,7 meses, 674,7±18,6 kg e ECC 5,9±0,1), criados a campo, em regime de pastejo contínuo. Os animais foram classificados como pertencentes às Linhagens A, N e C após análise de genealogia. Previamente à entrada na estação de monta, os animais passaram por avaliação andrológica completa². Dentre os quesitos avaliados, foram considerados como de maior relevância para o trabalho: concentração espermática (CON, x10⁶ spz/mL), motilidade espermática progressiva (MP, %), defeitos espermáticos maiores (DEFMa, %), menores (DEFMe, %) e totais (DEFt, %) e perímetro escrotal (PE, cm). Adicionalmente, os animais foram categorizados em função de nota (NT) obtida após aplicação do modelo matemático: $NT = (3 \times DEFMa) + (2 \times DEFMe) + (1 \times 1/MP)$, segundo o qual, quanto maior a qualidade seminal, menor o valor absoluto do escore³. Assim, em função da nota atribuída, os touros foram designados como superiores (SUP; NT≤45,0) ou intermediários (INT: 45,0<NT≤ 80,0). Nenhum dos animais foi categorizado como inferior (INF: NT>80,0). Os touros foram desafiados anualmente a cobrir a campo lotes compostos, em média, por 40 fêmeas Canchim cíclicas (n=990), durante as estações de monta (90 dias/estação/ano). Após 60 dias do final da estação, as fêmeas foram submetidas a diagnóstico gestacional por ultrassonografia transretal. Para análise estatística, os dados de qualidade seminal foram submetidos à avaliação da normalidade dos resíduos, seguidos de análise de variância. Em caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey. A taxa de prenhez (TP, %) alcançada por cada touro foi calculada pela razão entre o número de fêmeas gestantes e o total de fêmeas expostas por estação. As comparações entre as taxas de prenhez de cada linhagem foram realizadas pelo teste Binomial, considerando duas proporções amostrais independentes, onde o tamanho da amostra foi dado pelo número de vacas expostas, e o número de sucessos dado em função das vacas com prenhez positiva. A proporção de referência adotada foi de 80,3% relativa ao índice de sucesso observado na população (MP,%) do estudo ao longo dos quatro anos experimentais. Por sua vez, as comparações entre as taxas de prenhez dos animais classificados como SUP ou INT foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado. O nível de significância previamente adotado em todas as análises foi de 5%.

Resultados e Discussão - O PE, os parâmetros seminais e a TP não apresentaram diferença significativa entre linhagens (Tabela 1). Isso pode ser explicado pelo fato desses animais

serem oriundos de um rebanho que participa de programa de melhoramento genético instituído há mais de 60 anos⁴. Assim, são reprodutores rotineiramente avaliados em exame andrológico e selecionados conforme critérios de biometria escrotal⁵, além de passarem por sistemática avaliação qualidade seminal² e rigorosa seleção em função de seus parâmetros andrológicos. Os touros das linhagens N e C apresentaram maiores taxas de prenhez comparativamente à média alcançada pelos touros no período estudado (Figura 1A), sugerindo maior adaptabilidade ao meio ambiente desses animais.

Tabela 1. Valores médios (\pm erro padrão) dos parâmetros seminais, perímetro escrotal e taxas de prenhez de touros Canchim (n=27) das linhagens Antiga (A), Nova (N) e Cruzada (C) durante as estações de monta de 2014 a 2017.

| Linagem | CON | MP | DEFMa | DEFMe | DEFt | PE | TP |
|---------|-------------------|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| A | 586.4 \pm 99.9 | 65.0 \pm 3.2 | 8.4 \pm 1.7 | 10.2 \pm 1.5 | 18.6 \pm 2.4 | 38.1 \pm 0.9 | 74.6 \pm 4.1 |
| N | 900.0 \pm 128.4 | 74.0 \pm 2.9 | 6.0 \pm 2.2 | 8.6 \pm 1.6 | 14.6 \pm 2.8 | 38.1 \pm 0.9 | 83.8 \pm 3.2 |
| C | 644.1 \pm 206.0 | 69.1 \pm 3.1 | 6.6 \pm 1.8 | 12.0 \pm 2.9 | 18.6 \pm 2.6 | 36.7 \pm 0.6 | 81.5 \pm 3.5 |
| Média | 710.2 \pm 144.7 | 69.4 \pm 3.1 | 7.0 \pm 1.9 | 10.3 \pm 2.0 | 17.2 \pm 2.6 | 37.6 \pm 0.8 | 79.9 \pm 3.6 |

CON: concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL), MP: motilidade espermática progressiva (%), DEFMa: defeitos maiores (%), DEFMe: defeitos menores (%), DEFt: defeitos totais (%), PE: perímetro escrotal (cm) e TP: taxa de prenhez (%)

Considerando a categorização pela qualidade seminal, touros SUP apresentaram maior taxa de prenhez (Figura 1.B). Isso ocorreu devido ao fato destes apresentarem um espermograma de mais alta qualidade, com menor incidência de defeitos espermáticos, associada, em geral, a mais alta motilidade progressiva. Essas variáveis são de suma importância, pois grande quantidade de defeitos espermáticos incompatíveis no ejaculado é incompatível com altas taxas de fertilização⁶. Touros com esse tipo de anomalia espermática apresentam baixa motilidade e reduzido vigor⁷. A motilidade das células espermáticas é um dos parâmetros seminais altamente correlacionado à fertilidade⁸. No entanto, a motilidade avaliada de forma isolada das outras variáveis não pode prever a capacidade de fertilização dos espermatozoides⁹. Outro aspecto positivo a ser considerado ao se detectar touros com qualidade seminal superior é o fato disso possibilitar a redução da proporção touro:vaca nas estações de monta, sem ocasionar prejuízos na taxa de fertilidade do rebanho¹⁰.

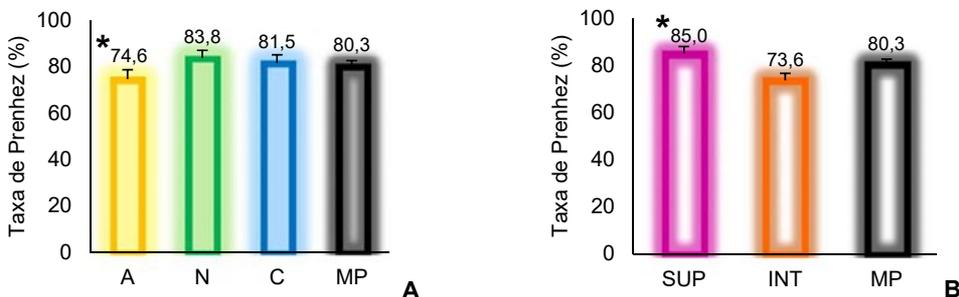


Figura 1. (A) Valores médios (\pm erro padrão) das taxas de prenhez obtidas por touros Canchim das Linhagens: Antiga (A), Nova (N) e Cruzada (C), e taxa média de prenhez da população (MP, %). (B) Taxa de prenhez dos touros classificados como superiores (SUP) ou intermediários (INT) em função da qualidade seminal. *indica diferença significativa ($P < 0,05$).

Considerações Finais - O presente estudo demonstrou a importância da utilização de touros com qualidade seminal superior e seu reflexo positivo nas taxas de prenhez das estações de monta.

Referências Bibliográficas

- [1] Arruda R.P.; Celeghini E.C.C.; Souza L.W.O.; Nascimento J.; Andrade A.F.C.; Raphael C.F.; Garcia A.R., 2005. Importance of semen quality in fixed-time artificial insemination and embryo transfer programs. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33 (Suppl 1): 145-150.
- [2] CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**, terceira ed. Belo Horizonte, Brasil. pp. 104.
- [3] Garcia, A.R., 2004. Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros Simental (*Bos taurus taurus*). Tese, Universidade de São Paulo, Brasil.
- [4] Vianna, A.T.; Gomes, F.P.; Santiago, M. **Formação do gado Canchim pelo cruzamento Charolês-Zebu**. 2.ed. São Paulo: Nobel, 1978, 193p.
- [5] ABCCAN – Associação Brasileira de Criadores de Canchim, 2000. **Padrão Racial: Canchim 2000**. São Paulo, Brasil. pp.21.
- [6] Amaral, T.B., Sereno, J.R.B., Pellegrin, A.O., 2009. Fertilidade, funcionalidade e genética de touros zebuínos: dados eletrônicos. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br/download/>. (Acesso em 15.04.2018).
- [7] Arruda, R.P., Celeghini, E.C.C., Garcia, A.R., Santos, G.C., Leite, T.G., Oliveira, L.Z., Lançonni, R., Rodrigues, M.P., 2015. Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 39, 47-60.
- [8] Al-Makhzoumi, A., Lundeheim, N., Håård, M., Rodríguez- Martínez, H., 2008. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. *Theriogenology* 70, 682-691.
- [9] Lewis, S.E.M., 2007. Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 134, 31-40.
- [10] Sereno, J.R.B., Costa e Silva, E.V, Mores, C.M, 2002. Redução da proporção touro:vaca no Pantanal brasileiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37(12):1811-1817.

Agradecimentos: Embrapa Pecuária Sudeste (Projetos Rede BIOTEC #01.13.06.001.05.00 e ADAPT+ #02.12.02.008.00.03.007); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

Morfometria espermática de touros Tabapuã, Nelore e Angus e a relação com parâmetros de cinética e morfologia espermática

Luana Gomes Fernandes¹
luanagfernandes95@gmail.com

Naiara Nantes Rodrigues²

Maria Eugênia Zerlotti Mercadante³

Fabio Morato Monteiro³
monteiro@iz.sp.gov.br

Abstract: The aim of this study was to compare and correlate morphometry, motility and sperm morphology in bulls Tabapuã, Nelore and Angus. Thirty-seven frozen semen straws were used (Tabapuã, n=05; Nelore, n=18; Angus, n=14). After thawing the semen, morphometry analysis of spermatic head, motility (through the CASA system) and morphology were performed. The data were analyzed by PROC GLM and PROC CORR of SAS® program ($p < 0.05$). Sperm head morphometry was lower in Angus bulls however, these animals showed no difference in sperm head length when compared to Tabapuã bulls and in width with Nelore bulls. A higher percentage of sperm defects was observed in the semen of Tabapuã bulls. The correlation between morphometry characteristics and semen motility and morphology was few and low. In conclusion, bull's breed influences sperm morphometry and morphology patterns and the biometry of the spermatozoid's head seems to alter speed of sperm cell.

Keywords: andrological; *Bos indicus*; *Bos taurus*.

Palavras-chave: andrológico; *Bos indicus*; *Bos taurus*.

Introdução - Dentre as etapas do espermograma o estudo das alterações morfológicas é um dos melhores indicadores da qualidade seminal (MARTÍ et al., 2012). Porém, caracterizada como uma análise subjetiva e seus resultados insatisfatórios podem ser minimizados por meio da avaliação morfométrica, determinando de forma quantitativa a biometria dos espermatozoides considerados normais e anormais de um ejaculado (GRAVANCE et al., 1996). Assim, o interesse pelo formato do espermatozoide e sua correlação com os parâmetros morfológicos e de motilidade tornou-se uma busca frequente, uma vez que, o tamanho da célula espermática pode ser utilizado em conjunto com outras análises como um indicador do status reprodutivo do macho (MARTÍ et al., 2012). Portanto, o objetivo do estudo foi comparar e correlacionar a morfometria, motilidade e morfologia espermática em touros Tabapuã, Nelore e Angus.

¹ UFPR - Setor Palotina

² FCAV- UNESP

³ Centro APTA Bovinos de Corte, IZ

Material e Métodos - O trabalho foi realizado no Instituto de Zootecnia, situado no município de Sertãozinho/SP/Brasil. Foram utilizadas 37 amostras seminais pós-descongelamento de touros Tabapuã ($n= 05$), Nelore ($n= 18$) e Angus ($n= 14$). O descongelamento das palhetas foi feito a temperatura de 37°C por 30 segundos e posteriormente avaliados quanto a cinética espermática, morfometria e morfologia espermática. A cinética espermática foi determinada por meio do sistema de Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA; Hamilton Thorne Research, IVOS-14, EUA), foi avaliado a motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %), velocidade rápida (RAP, %); velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$); velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$). A análise de morfometria espermática foi realizada com amostra de sêmen em solução de formol salina 4% entre a lâmina e lamínula e avaliada em microscópio com contraste de fase com aumento 100X. As mensurações da área (μm^2), comprimento (μm) e largura (μm) da cabeça de 100 espermatozoides por amostra seminal foram realizadas através do software NIS-Elements D3.0 - SP7 (Nikon® instruments Inc.®, NY, EUA). Para a morfologia espermática foram avaliados 200 espermatozoides por amostra e os defeitos classificados em defeitos maiores, menores e totais.

Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando o método dos quadrados mínimos, por meio do procedimento GLM do programa estatístico SAS® e o nível de significância adotado pelo teste de Tukey foi de 5%. No modelo foi incluído o efeito fixo de raça. Os dados de morfometria, motilidade e morfologia espermática foram analisados pelo PROC CORR (correlação de Pearson) do programa SAS.

Resultados e Discussão - No presente estudo não houve diferenças entre as raças nas avaliações de cinética espermática (Tabela 1). Entretanto, as características morfométricas da cabeça do espermatozoide foram diferentes entre os grupos raciais estudados. Touros Tabapuã apresentaram maior área da cabeça do espermatozoide, o comprimento foi diferente entre Nelore e Angus, e a largura da cabeça da célula espermática semelhante entre Tabapuã e Nelore e menor em Angus. Essas variações podem ser justificadas em função da subespécie bovina (*Bos taurus* x *Bos indicus*). No entanto, Beletti et al. (2005) observaram tendência dos espermatozoides de touros *Bos indicus* serem menores quando comparados a *Bos taurus*, diferente do observado no presente estudo, no qual touros Angus (*Bos taurus*) apresentaram menor área da cabeça dos espermatozoides que as demais raças estudadas. As medidas de comprimento e largura foram semelhantes entre as raças. A avaliação da morfologia espermática evidenciou diferenças principalmente entre Tabapuã e Angus, sendo que animais do grupo genético *Bos taurus* apresentaram menores porcentagens de defeitos maiores, menores e totais, corroborando com os resultados relatados por Brito et al. (2002). Neste contexto, touros Tabapuã apresentaram maior porcentagem de alterações na morfologia espermática, contudo a afirmação, baseada nesses resultados de que animais *Bos indicus* teriam qualidade seminal inferior a *Bos taurus* seria errônea, uma vez que touros Nelore são pertencentes a mesma subespécie e não apresentaram todos os defeitos espermáticos que touros Tabapuã.

Os resultados do presente estudo demonstraram correlação negativa entre a área e o comprimento da cabeça do espermatozoide com a velocidade linear (VSL), corroborando com os dados de Gil et al. (2009), os quais observaram em suínos que características de movimento dos

espermatozoides, como velocidade média do trajeto (VAP) e VSL sofrem influência da morfometria da cabeça espermática e da peça intermediária, os autores relataram que quanto maior a área e o comprimento, menores são as velocidades do espermatozoide. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que apenas VSL foi influenciada pela área e comprimento da cabeça do espermatozoide, entretanto as correlações foram baixas (-0,34 e 0,32, respectivamente).

Tabela 1. Média \pm SEM das variáveis de morfometria, cinética e morfologia espermática de touros das raças Tabapuã, Nelore e Angus.

| Variáveis | Raças | | | P |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------|
| | Tabapuã (n=5) | Nelore (n=18) | Angus (n=14) | |
| Área (μm^2) | 39,75 \pm 0,55 ^a | 36,74 \pm 0,29 ^b | 35,75 \pm 0,33 ^c | 0,0001* |
| Comp. (μm) | 9,54 \pm 0,10 ^{ab} | 9,57 \pm 0,05 ^a | 9,39 \pm 0,06 ^b | 0,0294* |
| Larg. (μm) | 4,95 \pm 0,06 ^a | 4,83 \pm 0,03 ^{ab} | 4,73 \pm 0,04 ^b | 0,0283* |
| MT (%) | 63,20 \pm 7,61 | 65,66 \pm 4,01 | 66,71 \pm 4,55 | 0,9245 |
| MP (%) | 41,40 \pm 5,60 | 47,66 \pm 2,95 | 51,07 \pm 3,34 | 0,3384 |
| RAP (%) | 57,60 \pm 7,56 | 61,66 \pm 3,98 | 63,42 \pm 4,51 | 0,8039 |
| VAP ($\mu\text{m/s}$) | 82,62 \pm 5,11 | 82,22 \pm 2,69 | 88,17 \pm 3,5 | 0,4306 |
| VSL ($\mu\text{m/s}$) | 64,34 \pm 3,73 | 67,09 \pm 1,96 | 72,70 \pm 2,23 | 0,0881 |
| VCL ($\mu\text{m/s}$) | 136,06 \pm 10,10 | 135,79 \pm 5,32 | 142,70 \pm 6,03 | 0,6734 |
| Def. Mai (%) | 9,30 \pm 1,61 ^a | 6,86 \pm 0,84 ^{ab} | 4,57 \pm 0,99 ^b | 0,0442* |
| Def. Men (%) | 8,60 \pm 1,41 ^a | 3,86 \pm 0,74 ^b | 3,50 \pm 0,87 ^b | 0,0107* |
| Def. Tot (%) | 17,90 \pm 2,34 ^a | 10,72 \pm 1,23 ^b | 8,07 \pm 1,45 ^b | 0,0046* |

Letras indicam diferenças entre raças. *P \leq 0,05. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; VAP: velocidade de percurso; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; Def. Mai: defeito maior; Def. Men: defeito menor; Def. Tot: defeito total.

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as variáveis de morfometria, motilidade e morfologia espermática de touros das raças Tabapuã, Nelore e Angus.

| | Comp | Larg | MT | MP | RAP | VAP | VSL | VCL | Def. Mai | Def. Men | Def. Tot |
|------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|----------|----------|----------|
| Área | 0,44* | 0,63* | -0,004 | -0,20 | -0,06 | -0,18 | -0,34* | -0,10 | -0,04 | 0,46* | 0,24 |
| Comp | 1 | -0,04 | 0,003 | -0,01 | -0,02 | -0,15 | -0,32* | -0,09 | -0,02 | 0,13 | 0,06 |
| Larg | | 1 | -0,07 | -0,11 | -0,11 | -0,24 | -0,28 | 0,17 | 0,0004 | 0,38* | 0,22 |
| MT | | | 1 | 0,89* | 0,98* | 0,37* | 0,25 | 0,33* | -0,36* | -0,16 | -0,33* |
| MP | | | | 1 | 0,91* | 0,33* | 0,40* | 0,23 | -0,26 | -0,16 | -0,26 |
| RAP | | | | | 1 | 0,46* | 0,36* | 0,41* | -0,39* | -0,16 | -0,34* |
| VAP | | | | | | 1 | 0,90* | 0,96* | -0,41* | -0,0082 | -0,26 |
| VSL | | | | | | | 1 | 0,82* | -0,31 | -0,03 | -0,22 |
| VCL | | | | | | | | 1 | -0,42* | 0,06 | -0,23 |

Valores apresentados com asterisco (*) referem-se a variáveis com correlação significativa p<0,05. MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; VAP: velocidade de percurso; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; Def. Mai: defeito maior; Def. Men: defeito menor; Def. Tot: defeito total.

Considerações Finais - O grupo genético pode determinar diferenças nas características de biometria do espermatozoide, assim como a morfologia espermática sofre influência da raça avaliada. Além disso, a maior área e comprimento da cabeça do espermatozoide influenciaram negativamente a velocidade linear (VSL) dos espermatozoides.

Referências Bibliográficas

- [1] MARTI, J.I.; APARICIO, I.M.; LEAL C.L.V.; GARCIA-HERREROS, M. Seasonal dynamics of sperm morphometric subpopulations and its association in ram ejaculates. **Theriogenology**, v.78, p.528-541, 2012.
- [2] GRAVANCE, C.G.; VISHWANATH, R.; PITT, C.; CASEY, P.J. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. **Theriogenology**, v.46, p.1205-1215, 1996.
- [3] BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. **Anim. Reprod. Sci.**, v.85, p.105-116, 2005.
- [4] BRITO, L.F.C.; SILVA, A.E.D.F.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.G.; KASTELIC, J.P. Effect of age and genetic on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.58, p.1175-1186, 2002.
- [5] GIL, M.C.; GARCIA-HERREROS, M.; BARON, F.J.; APARICIO, L.M.; SANTOS, A.J.; GARCIA-MARIN, L.J. Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. **Theriogenology**, v.71, p.254-260, 2009.

Agradecimentos: Seleon Biotecnologia e Centro APTA Bovinos de Corte, Instituto de Zootecnia.

Influência da catalase na integridade de membrana do sêmen criopreservado de machos Nelore suplementados com ácidos graxos poliinsaturados

Natália Marins Bastos¹
nataliamarinsbastos@yahoo.com.br

Guilherme Fazan Rossi¹
guilhermemedvet@yahoo.com.br

Naiara Nantes Rodrigues¹

Dayane Priscila Virsman¹

Mariana Furtado Zorzetto³

Camila de Paula Freitas Dell'Aqua²

Fabio Morato Monteiro³

Gisele Zoccal Mingoti⁴

Vera Fernanda Martins Hossepian de Lima¹
veralima@fcav.unesp.br

Abstract: The aim of this study was to evaluate the influence of catalase on the frozen semen quality of Nelore bulls supplemented with polyunsaturated fatty acid (PUFAs) from 14 to 24 months of age. Semen samples from 12 Nelore bulls were divided into 2 groups: group 1 (G1) supplemented with PUFAs and group 2 (G2) had no PUFAs supplementation. Semen collection was performed by electroejaculation. The semen samples were divided into 2 fractions; with supplementation of catalase (C +) and without catalase (C-). Semen was cooled and frozen in automatic cryopreservation system. The post-thaw evaluations were performed by flow cytometry and the evaluated parameters were plasma and acrosomal membrane (PAM) integrity. The G1 presented spermatozoa with higher PAM damage in relation to G2. Supplementation with PUFAs possibly resulted in the lipid peroxidation of cell membranes contributing to the acrosome reaction, reducing the integrity of sperm membranes and seminal quality.

Palavras-chave: AGPs; antioxidante; bovinos

Keywords: antioxidant; bovine; PUFA

Introdução - Em geral, por serem um dos principais componentes das membranas dos espermatozoides, os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs), se associam às características fisiológicas da membrana afetando a qualidade do espermatozoide [1]. A composição lipídica

¹ FCAV-UNESP Jaboticabal

² FMVZ-UNESP Botucatu

³ Instituto de Zootecnia (IZ) de Sertãozinho

⁴ FMVA - UNESP Araçatuba

da membrana é um dos maiores determinantes da motilidade, sensibilidade ao processo de criopreservação, viabilidade do sêmen, capacidade de fusão dos gametas, influenciando diretamente na taxa de fertilidade [2]. Entretanto, a presença de AGPs nas membranas celulares podem torna-los susceptíveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento dos níveis de EROs pode acarretar à peroxidação lipídica das membranas, gerando uma cascata de eventos bioquímicos [3] sendo responsável pela alta perda dos AGPs membranares, os quais são essenciais para a fluidez das membranas. Portanto, a peroxidação lipídica pode causar danos celulares como: alterações no metabolismo, liberação de componentes intracelulares, alterações no DNA e alteração da integridade da membrana [4]. Dentro do contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da catalase na qualidade do sêmen de touros da raça Nelore suplementados com fontes de ácidos graxos poli-insaturados.

Material e Métodos - Foram utilizadas amostras de sêmen de 12 touros da raça Nelore do Instituto de Zootecnia (IZ), com idade média de $24,6 \pm 0,13$ meses e peso médio de $521,4 \text{ kg} \pm 11,4 \text{ kg}$. Os animais foram mantidos a pasto de *Brachiaria brizantha cv Marandu* com acesso a água e sal proteinado *Ad libitum*. Os animais foram divididos em 2 grupos de 6 animais, sendo o grupo 1 (G1) suplementado com ácidos graxos poliinsaturados (AGPs; 1 kg/animal/dia) e grupo 2 (G2) sem suplementação com AGPs (controle; 1,25 kg/animal/dia). As dietas foram isoproteicas e isoenergéticas. Para isso, os animais do G2 receberam 0,25 kg de suplemento/dia a mais do que os animais do G1. A fonte de gordura utilizada foi Megalac-E® (200 g/animal/dia) [5] e os touros foram suplementados dos 14 até aos 24 meses de idade. A colheita de sêmen foi realizada apenas uma vez, aos $24,6 \pm 0,13$ meses, com o auxílio de um eletroejaculador e o sêmen foi diluído no meio BotuBov®, contendo 7% de crioprotetor glicérol e dividido em duas frações de igual composição, sendo que a primeira (C+) havia a presença de catalase (51,5 µg/ml de diluidor) e a segunda (C-) era desprovida de catalase. Para a congelação, o sêmen foi envasado à temperatura ambiente em palhetas de 0,5 mL (50×10^6 spz/mL). Para o resfriamento e congelamento, foi utilizado um sistema de criopreservação de sêmen automático e portátil (Tetakon, TK 4000). As curvas de resfriamento e congelação foram de $0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ até 5°C ; e $-15^\circ\text{C}/\text{min}$ de 5°C a -80°C e $-20^\circ\text{C}/\text{min}$ a -140°C . Após a congelação as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C). A descongelação foi realizada em banho-maria a 36°C em 30s. Para as análises das integridades de membranas plasmática e acrossomal, por citometria de fluxo, foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm e 695/40nm; vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20nm; e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50nm. No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1 [6]. As amostras foram diluídas em TALP-PVA [7], 100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL [6]. Além disso, foi utilizado a associação de Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acor-

do Freitas-Dell'Aqua [6]. Portanto, em uma amostra de 200µL de sêmen diluído foi adicionado 7µM de H342, 1,5µM de PI e 2ng de FITC-PSA, incubado a 37°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Foram analisados a porcentagem aparente dos seguintes parâmetros: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra (MPLAI), membrana plasmática e acrossomal lesionadas (MPAL), membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI), membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada (MPIAL). Os parâmetros acima citados foram analisados com modelo incluindo os efeitos fixos da classe de suplementação (i=1, 2), da classe de catalase (i=1, 2) e da interação, utilizando o procedimento MIXED do programa SAS[®]. As médias foram comparadas pelo teste t. Foi considerado o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão - No presente estudo, G1 apresentou espermatozoides com maiores taxas de membrana plasmática e acrossomal lesionada ($P < 0,05$) em relação ao G2 (Tabela 1). Não foi observado diferenças para grupos da catalase e nem significância para a interação entre os efeitos de suplementação e catalase (Tabela 1). Os danos do sêmen pós descongelamento nas membranas celulares dos animais do grupo suplementado foram aproximadamente 3,91 vezes superiores em relação ao grupo controle (Tabela 1). Byrne e colaboradores [8] não encontraram diferenças entre os tratamentos para permeabilidade de membrana, no sêmen de touros da raça Holandesa, quando suplementados com ácidos linoleico (n-6) e linolênico (n-3).

Tabela 1. Médias estimadas por quadrados mínimos dos parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo, sob presença e ausência de catalase no meio diluidor do sêmen de machos da raça Nelore suplementados ou não com AGPs.

| CITOMETRIA DE FLUXO ¹ | P VALOR ² | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|-------|-------|------|-------|------|---------|
| | G1 | G2 | C- | C+ | EPM | SUP | CAT | SUP*CAT |
| MPLAI (%) | 40,83 | 44,99 | 44,67 | 41,36 | 3,08 | 0,351 | 0,48 | 0,49 |
| MPAL (%) | 11,29 ^a | 2,89 ^b | 6,53 | 7,65 | 2,06 | 0,009 | 0,70 | 0,46 |
| MPAI (%) | 47,72 | 52,05 | 48,91 | 50,86 | 3,14 | 0,34 | 0,67 | 0,84 |
| MPIAL(%) | 0,16 | 0,06 | 0,10 | 0,12 | 0,06 | 0,25 | 0,85 | 0,70 |

G1: animais do grupo suplementado com AGPs; G2: animais do grupo sem AGPs; C-: fração de diluidor desprovida de catalase; C+: fração de diluidor provido de catalase; EPM: Erro padrão da média.¹- Citometria de fluxo: MPLAI: membrana plasmática lesionada e acrossomal íntegra; MPAL: membrana plasmática e acrossomal lesionadas; MPAI: membrana plasmática e acrossomal íntegras; MPIAL: membrana plasmática íntegra e acrossomal lesionada. ² SUP: Valor de P entre a suplementação; CAT: Valor de P entre a catalase; SUP*CAT: Valor de P entre a interação SUP e CAT. ^{a,b} Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ($p < 0,05$).

Borges e colaboradores [3] observaram que a geração de EROs é necessária para inúmeros processos como: maturação espermática, capacitação, reação acrossômica, estabilização da mitocôndria e fusão do espermatozoide / ovócito. Entretanto, a produção excessiva desses metabolitos é associada à diminuição da fertilização originada pela baixa qualidade espermática. Durante o processo de criopreservação, há a alteração do fluxo de Ca^{++} no citoplasma, sendo este muitas vezes responsável pela desestabilização das membranas plasmática e across-

somal [3]. EROs oriundas da peroxidação lipídica, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e íons Ca⁺⁺ ativam as enzimas fosfolipases nas membranas. Essas enzimas são responsáveis pela reação acrossomica. A peroxidação lipídica possui correlação negativa com a integridade acrossomica (r=-0,54) e integridade de membrana (r=-0,52) no sêmen pós congelação [9]. Portanto, no presente estudo, a suplementação com fontes de AGPs possivelmente acarretou na peroxidação lipídica das membranas celulares contribuindo para a reação do acrossoma, diminuindo a integridade das membranas dos espermatozoides e consequentemente a qualidade seminal.

Conclusões - Os animais suplementados com AGPs apresentaram danos nas membranas plasmática e acrossomal superiores aos animais controle. A catalase não influenciou na integridade das membranas.

Referências Bibliográficas

- [1] VAN TRAN, L. ; MALLA, B.A. ; KUMAR, S. ; TYAQI, A.K. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction — A Review. **Asian-australasian Journal Of Animal Sciences**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.622-637, 4 mar. 2016. Asian Australasian Association of Animal Production Societies. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.15.1034>.
- [2] PETER, S.; RAYMOND, C. N. **Male fertility with antioxidants and/or polyunsaturated fatty acids**. Patente No 6235783. United States, 2001.
- [3] BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p.303-314, set. 2011.
- [4] AMIDI, F; PAZHOHAN, A.; NASHTAEI, M.S.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell And Tissue Banking**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.745-756, 24 jun. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-016-9566-5>.
- [5] HERNÁNDEZ, M. M. R.; PATINO, H. O.; GREGORY, R. M.; ANGEL, J. C.; RE del, D.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados e qualidade seminal pré e pós-congelação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.49, n.6, p.471-479, 2012.
- [6] FREITAS-DELLAQUA, C.P.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D; DELLAQUA JR J.A.; PAPA, F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Anim Reprod** (2012) 9-941.
- [7] PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A ; FIRST, N.L. Capacitation on bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, p.1171-1180, 1988.
- [8] BYRNE, C.J. ; FAIR, S. ; ENGLISH, A.M. ; HOLDEN, S.A. ; DICK, J.R. ; LONERGAN, P. ; KENNY, D.A. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation of young post-pubertal dairy bulls alters the fatty acid composition of seminal plasma and spermatozoa but has no effect on semen volume or sperm quality. **Theriogenology**, [s.l.], v. 90, p.289-300, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.014>.
- [9] LONE, S.A.; PRASAD, J.K.; GHOSH, S.K.; DAS, G.K.; BALAMURUGAN, B.; VERMA, M.R. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. **Andrologia**. 2018;e12970. <https://doi.org/10.1111/and.12970>

Agradecimentos - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Instituto de Zootecnia e Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal (CERAN).

Avaliação das características andrológicas de ovinos das raças Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel

Carlos Augusto Capelassi Gomes¹
carlosgomescapelassi@gmail.com

Leandro da Silva Correa¹

Marcelo Henrique Fumagalli¹

Jeniffer Naryman Hirt¹

Fabiola Cristine Rêgo Grecco¹

Luiz Fernando Coelho da Cunha Filho¹

Flávio Guiselli Lopes¹

Abstract: The objective of this study was to evaluate the andrological characteristics of Dorper, Ile de France, Santa Inês and Texel sheep from different regions of the State of Paraná and Brazil, during the Agricultural Exhibition of Londrina/ PR between 2015 to 2017. It was used 161 breeding herds, which presented good body condition and were submitted to the andrological exam. After completion of the andrological examination, breeders were grouped into two age categories, from 06 to 12 months and from 13 to 24 months. It was concluded that the andrological characteristics varied little among the four breeds of sheep studied, even when grouped into two age categories. The results obtained in the study can be used as reference values for the Dorper, Ile de France, Santa Inês and Texel breeds.

Keywords: seminal characteristics; sheep; reproduction

Palavras-chave: características seminais; ovino; reprodução

Introdução - Existem poucos estudos relacionados com as raças estudadas, podendo os resultados serem utilizados para caracterização de parâmetros andrológicos. Para acelerar o incremento na produtividade, aliada ao melhoramento genético, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas para o aprimoramento das biotecnologias da reprodução [1]. Sob o ponto de vista do melhoramento genético o reprodutor pode agregar ganhos genéticos em quesitos importantes para a eficiência produtiva e reprodutiva, como ganho de peso, qualidade de carne, facilidade para parto, idade a puberdade [2]. Neste contexto, o desempenho reprodutivo dos machos é de fundamental importância, pois são passíveis de maior pressão de seleção [3]. O presente estudo teve como objetivo avaliar as características andrológicas de ovinos das raças Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel provenientes de diferentes regiões do Estado do Paraná e do Brasil, durante a Exposição Agropecuária de Londrina e, verificar os possíveis efeitos da idade e de diferentes condições de clima e manejo sobre as características seminais e perímetro escrotal.

¹ Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) / Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes, Unidade Araçongas.

Material e Métodos - O presente estudo foi realizado entre os anos de 2015 a 2017, na Exposição Agropecuária de Londrina (Expo Londrina), Londrina/ PR, no Setor de Ovinocultura, utilizando 161 reprodutores de quatro diferentes raças, Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel, provenientes de diferentes regiões do Estado do Paraná e do Brasil. Os reprodutores se apresentavam em bom estado corporal e foram submetidos ao exame andrológico, de acordo com os parâmetros recomendados pelo [4]. Após a finalização do exame andrológico, os reprodutores foram classificados em aptos ou satisfatórios, questionáveis e inaptos temporariamente ou permanente à reprodução, sendo agrupados em duas categorias de idade, de 06 a 12 meses e de 13 a 24 meses. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os valores médios foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados e Discussão - No presente estudo, dos 161 reprodutores avaliados, 98,13% (n= 158) foram considerados aptos ou satisfatórios e, apenas 1,84% (n=03), foram considerados inaptos temporariamente à reprodução. Estes resultados demonstram a alta capacidade dos reprodutores em se adaptarem ao ambiente de feiras e/ ou exposições, pois em sua maioria apresentaram padrão seminal para seleção de reprodutores ovinos para monta natural e/ ou criopreservação de sêmen. Por mais que diversos fatores possam influenciar os reprodutores, principalmente nas características seminais, no presente estudo isso não ocorreu. Os três animais classificados como inaptos temporariamente à reprodução, foram impedidos de participarem das pistas de julgamento, por apresentarem azoospermia. O valor observado para as características andrológicas foi de baixa variabilidade entre os reprodutores, entre as duas categorias de idade. Na categoria de machos de idade de 06 a 12 meses, não foi encontrada diferença (P<0,05) entre as raças, para volume do ejaculado, motilidade retilínea, turbilhão, vigor, concentração, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais espermáticos. Contudo, foi verificada diferença (P<0,05) para o perímetro escrotal (PE) entre as raças, onde PE dos machos da raça Dorper foi maior aos machos Santa Inês e Texel e semelhante aos machos Ile de France (Tabela 1).

Tabela 1. Características andrológicas (X ± DP) de machos das raças Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel, com 6 a 12 meses.

| Características andrológicas | Raça | | | | Significância |
|------------------------------|---------------|----------------------|-------------------|--------------|---------------|
| | Dorper (n=11) | Ile de France (n=15) | Santa Inês (n=24) | Texel (n=34) | |
| PE (Cm) | 34,36±1,28a | 33,33±1,95ab | 31,79±2,20b | 32,55±2,35b | * |
| Vol. (mL) | 0,90±0,22 | 0,80±0,52 | 0,79±0,28 | 0,91±0,40 | NS |
| Motilidade (%) | 91,36±2,33 | 88,00±6,21 | 85,41±5,29 | 84,85±5,14 | NS |
| Turbilhão (1-5) | 5,0±0,0 | 4,66±0,72 | 4,70±0,69 | 4,38±0,73 | NS |
| Vigor (1-5) | 5,0±0,0 | 4,60±0,73 | 4,75±0,60 | 4,44±0,74 | NS |
| DM (%) | 6,45±1,36 | 5,66±1,04 | 6,04±1,78 | 5,38±2,10 | NS |
| Dm (%) | 3,72±1,73 | 5,00±2,32 | 5,00±1,84 | 4,79±2,61 | NS |
| DT (%) | 10,18±2,82 | 10,66±2,99 | 11,04±2,92 | 10,17±3,45 | NS |
| Conc. (x10 ⁹) | 2,52±0,43 | 2,12±0,52 | 2,19±0,51 | 2,21±0,33 | NS |

Legenda: PE = perímetro escrotal; Vol. = volume do ejaculado; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = defeitos espermáticos totais e Conc. = concentração espermática. * = significativo; NS = não significativo; X = média; DP = desvio padrão. Média seguida de letras diferentes na mesma linha difere significativamente (P<0,05), pelo teste de Tukey.

Além disso, foi possível notar uma leve tendência, mas não significativa, para algumas características andrológicas, onde o volume do ejaculado foi superior nos machos da raça Dorper e Texel e a motilidade espermática maior nos machos Dorper e Ile de France. Destaca-se ainda a morfologia espermática, onde os machos Dorper apresentaram maior porcentagem de defeitos espermáticos maiores e menor porcentagem para os defeitos espermáticos menores. Na categoria de machos de idade de 12 a 24 meses, não foi observada diferença ($P < 0,05$) entre as raças, para perímetro escrotal, volume do ejaculado, motilidade retilínea, turbilhão, vigor, concentração, defeitos maiores e defeitos totais espermáticos. Porém, para os defeitos espermáticos menores (Dm) foi observada diferença ($P < 0,05$) entre as raças, onde os Dm dos machos da raça Dorper foi menor aos machos Texel e semelhante aos machos Ile de France e Santa Inês (Tabela 2). Fatores relacionados a individualidade do animal, a raça, a idade, o peso corporal, as características testiculares, assim como, variações climáticas e a quantidade e a qualidade dos alimentos podem influenciar no potencial reprodutivo e na qualidade do sêmen dos machos [5].

Tabela 2. Variáveis reprodutivas ($X \pm DP$) de machos das raças Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel, com 12 a 24 meses.

| Características Andrológicas | Raça | | | | Significância |
|---|---------------|----------------------|-------------------|--------------|---------------|
| | Dorper (n=13) | Ile de France (n=14) | Santa Inês (n=18) | Texel (n=32) | |
| PE (Cm) | 34,84±1,14 | 35,28±1,85 | 34,00±2,65 | 34,21±3,03 | NS |
| Vol. (mL) | 0,64±0,46 | 1,00±0,49 | 1,00±0,63 | 0,86±0,48 | NS |
| Motilidade (%) | 87,69±4,38 | 88,92±5,94 | 85,00±4,85 | 84,68±5,52 | NS |
| Turbilhão (1-5) | 4,53±0,51 | 4,64±0,63 | 4,72±0,46 | 4,46±0,76 | NS |
| Vigor (1-5) | 4,53±0,51 | 4,71±0,61 | 4,61±0,50 | 4,46±0,67 | NS |
| DM (%) | 6,15±1,14 | 5,85±2,50 | 5,44±1,29 | 4,78±1,73 | NS |
| Dm (%) | 2,92±1,84a | 4,28±2,09ab | 4,61±2,91ab | 5,43±2,12b | * |
| DT (%) | 9,07±2,36 | 10,14±3,41 | 10,05±2,97 | 10,21±2,69 | NS |
| Conc. ($\times 10^9$) | 2,59±0,13 | 2,53±0,42 | 2,27±0,45a | 2,43±0,40a | NS |

Legenda: PE = perímetro escrotal; Vol. = volume do ejaculado; DM = defeitos espermáticos maiores; Dm = defeitos espermáticos menores; DT = defeitos espermáticos totais e Conc. = concentração espermática. * = significativo; NS = não significativo; X = média; DP = desvio padrão. Média seguida de letras diferentes na mesma linha difere significativamente ($P < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Na categoria de idade de 12 a 24 meses, também, foi notada uma leve tendência, mas não significativa, para algumas características andrológicas, onde o volume do ejaculado foi maior nos machos da raça Ile de France e Santa Inês e a motilidade espermática maior nos machos Dorper e Ile de France. A maioria dos estudos que envolvem características andrológicas e quanto à aptidão reprodutiva baseia-se em trabalhos com raça Santa Inês. O desconhecimento a respeito das características reprodutivas das raças Dorper, Ile de France e Texel e dos fatores que podem afetá-los é atribuído, em parte, aos poucos estudos e publicações nessa área.

Considerações Finais - As características andrológicas pouco variaram entre as quatro raças de ovinos estudadas, mesmo quando agrupados em duas categorias de idade. Os resulta-

dos obtidos no estudo podem ser utilizados como valores de referência para as raças Dorper, Ile de France, Santa Inês e Texel.

Referências Bibliográficas

- [1] TREMORI, T.M.; MONTEIRO-TOMA, C.D.; RODELLO, L.; BICUDO, S.D. Avaliação da heterogeneidade espermática de carneiros por meio da análise morfométrica computadorizada não automatizada utilizando-se preparação úmida e coloração de Karras. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, v.38, n.3, p.154-158, 2014.
- [2] COSTA E SILVA, E.V.; COSTA FILHO, L.C.C.; SOUZA, C.C.; OLIVEIRA, C.C.; QUEIROZ, V.L.D.; ZÚCARI, C.E.S.N. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, v.39, n.1, p.22-31, 2015.
- [3] SIMPÍCIO, A.A.V.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotechniques of reproduction as techniques of reproductive management in sheep. *Rev. Bras. de Reprod. Anim.*, v.31, n.2, p.234-246, 2007.
- [4] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3th ed. Belo Horizonte; 2013.
- [5] MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.175-179, 2011.

Agradecimentos: Editora e Distribuidora Educacional SA – UNOPAR.

Em qual momento do processo de congelação do sêmen equino ocorrem as alterações das membranas espermáticas?

Carla Patricia Teodoro de Carvalho¹
patriciacarvalho2008@gmail.com

Eneiva Carla Carvalho Celeghini²

Guilherme Pugliesi³

Renata Lançoni¹

Gabriela Bertaiolli Zoca¹

Gabriel De Carli dos Santos¹

Laura Nataly Garcia Oliveros²

Danilo França de Souza¹

Thyago Escodro Dércoli¹

Rubens Paes de Arruda¹
arrudarp@usp.br

Abstract: During the freezing process the spermatid membranes undergo morphological changes in the organization and composition of perm lipids caused by variations in temperature and osmolarity. The objective of this study was to evaluate the effect of the freezing process on the integrity of the plasma, acrosomal and mitochondrial membranes (PIAIA), plasma membrane integrity (MPI), acrosomal (AI) and mitochondrial potential (APM) of equine spermatozoa diluted *in natura*, 5°C, -55°C and -196°C. In addition, verify the effect of two freezing curves during *supercooling* (0°C to -55°C). For the experiment, 4 stallions with 6 replicates and two different freezing curves (-15°C/min and -33°C/min) were used at different times of cryopreservation. There was a time effect ($P < 0.05$) for PIAIA, MPI, AI and APM. However, there was no statistical difference between the two freezing curves ($P > 0.05$). The damage suffered by the membranes increase as the freezing process progresses. Being that, the step -55°C and -196°C caused more damages PIAIA, MPI and APM. Already, AI suffered more injuries between 5°C and -55°C.

Keywords: Spermatozoa; stallion; freezing.

Palavras-chave: Espermatozoide; garanhão; congelação.

Introdução - O aumento do uso de biotecnologia na reprodução animal e o desenvolvimento de técnicas que beneficiam o processo de congelação e armazenamento de sêmen têm pro-

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.

³ Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular, Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Pirassununga, SP, Brasil.

porcionado melhor aproveitamento de gananhões de alto potencial genético. Assim, a utilização de espermatozoides criopreservados de gananhões tem impulsionado a inseminação artificial. No entanto, ainda apresenta reduzida fertilidade em relação ao sêmen refrigerado e ao *in natura* diluído, com taxas de gestação variando entre 35 a 90% quando comparado ao sêmen refrigerado e *in natura* diluído [1]. Desta maneira, tentar determinar o momento mais crítico durante de todo o processo de congelação seria o princípio para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes. Assim, este experimento teve como objetivo avaliar o efeito do processo de congelação na integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA), integridade das membranas plasmática (MPI), acrossomal (AI) e potencial mitocondrial (APM) de espermatozoides equinos *in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C. Além disso, verificar o efeito de duas curvas de congelação (-15°C/min e -33°C/min) durante o *supercooling* (0°C à -55°C).

Material e Métodos - O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA), pertencente ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP, localizado no *Campus* USP-Pirassununga, SP. Para realização do experimento foram utilizados 4 gananhões com 6 repetições. As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial modelo Botucatu[®] (Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) e, logo após a colheita, cada ejaculado foi filtrado e diluído (1:1) em diluidor a base de leite desnatado (BotuSêmen[®], Botu-Pharma, Botucatu, Brasil) e as características seminais foram avaliadas imediatamente no sêmen *in natura* diluído quanto ao motilidade (%), vigor (1-5), concentração (10^6 /mL). Posteriormente, a diluição em diluidor a base de leite desnatado, foi realizada a centrifugação a 500 x g durante 12 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* obtido foi suspenso com diluidor para congelação (Botu-Crio[®]-Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em temperatura ambiente ($\pm 22^\circ\text{C}$), resultando na concentração de 100×10^6 espermatozoides/palhetas. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e submetidos a uma curva de congelação 1 (rápida; $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ de 22°C até 5°C , com período de 20 minutos para estabilização, $-33^\circ\text{C}/\text{min}$ de 5°C até -80°C e, $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ de -80°C para -120°C) e a outra curva 2 (lenta; $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ de 22°C até 5°C , com -120°C), para isto, foram utilizadas duas máquinas de congelação modelo TK 3000 (TK 3000[®], TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Foram realizadas avaliações no sêmen *in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C. Para cada avaliação foram retiradas duas palhetas de sêmen de cada tratamento de uma mesma partida foram descongeladas e avaliadas células PIAIA, MPI, AI e APM. Para avaliação foi utilizado 150 μL de sêmen diluído em meio TALP *sperm* (1:3), na concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL, em tubo de microcentrífuga e adicionados 3 μL de iodeto de propídeo (PI 0,5 mg/mL), 2 μL de Hoescht 33342 (0,5 mg/mL), 6 μL de 5,5', 6,6' tetrachloro -1,1, 3,3' - tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1153 μM) e 80 μL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em seguida, a amostra foi incubada durante 8 minutos a 37°C no escuro, técnica adaptada [2]. Ao final foram contadas 200 células e classificadas em oito categorias segundo os padrões de fluorescência emitidos.

Resultados e Discussão - Verificou-se que durante o processo de congelação ocorreu redução PIAIA, APM, AI e MPI de forma progressiva ($P < 0,05$) entre as etapas analisadas (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C). No entanto, não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as duas curvas de congelação usadas. A etapa de refrigeração (*in natura* diluído até 5°C) não foi a mais prejudicial para PIAIA, MPI, AI e APM. Tendo em vista que, entre 19°C a 8°C a membrana espermática passa de uma fase líquida para fase gel [3]. No que se refere as avaliações realizadas em diferentes etapas da congelação, foi notado aumento numérico da porcentagem de espermatozoides com lesões de PIAIA, MPI, AI e APM. Porém, a etapa de -55°C até -196°C apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação as etapas *in natura* diluído até 5°C e 5°C até -55°C para PIAIA, MPI e APM. Para AI, não encontramos diferença estatística entre as duas curvas de congelação utilizadas, rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min), entretanto a etapa que mais causou lesões ao acrossomo foi 5°C até -55°C, momento onde está ocorrendo o *supercooling*. Similarmente, aos resultados obtidos, neste estudo, [4] não encontraram diferença para integridade acrossomal de espermatozoide de javali, utilizando uma curva de congelação de (-6°C/min) e (-40°C/min). Contudo, a redução da porcentagem média de células PIAIA foi maior no período entre -55°C até -196°C, isto ocorreu porque a MPI e o APM sofreram maior porcentagem de redução neste período interferindo no resultado final, provavelmente pela variação individual entre o sêmen dos ganhões e ejaculados. Ainda, nesta etapa do processo de congelação, as lesões ocorreram pela soma das lesões decorrentes das etapas anteriores.

Considerações Finais - O conhecimento sobre cada etapa do processo de congelação, bem como os efeitos causados a integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial de espermatozoides equino durante a criopreservação, são os primeiros passos para desenvolvimento de protocolos de congelação mais eficientes.

Referências Bibliográficas

- [1] MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Veterinary Journal*, v.34, n.1, p.51-60, 2002.
- [2] CELEGHINI, E. C. C.; DE ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; DE ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.53, n.6, p.1285-1292, 2010.
- [3] MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.
- [4] THURSTON, L.M.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, v. 60, p.101-113, 2003.

Agradecimentos: CAPES; FAPESP (2016/14626-7).

Carcinoma de células escamosas em prepúcio de cavalo Quarto de Milha

Felipe da Silva Neri¹
rfbvet1@gmail.com

Rodrigo Freitas Bittencourt¹

Catharina de Albuquerque Vieira¹

Alessandro Bitencourt Nascimento¹

Lara Nunes Sousa²

Mariana de Queiroz Sampaio²

Maicon Pereira Lents¹

Adriano de Oliveira Gordilho Filho²

João Victor Gomes da Silva Carvalho¹

Maristela de Cássia Seudo Lopes²

Abstract: Squamous cell carcinoma affects horses mainly in the region of the penis and foreskin, may have varied causes and are more frequent in depigmented areas. It has an invasive and metastatic character, producing ulcerated lesions with formation of crusts, compromising the circulation of the region, causing the formation of edema. The objective was to report a case of squamous cell carcinoma on the foreskin of a Quarter Horse. The squamous cell carcinoma of the carotid caused a volume increase in the preputial region, of a very firm texture, leaving the animal with inability to expose the penis. The animal had ulcerations in the preputial cavity and discomfort when urinating. The animal underwent urethrostomy surgery with block removal of the penis and foreskin to remove the tumor mass. The histopathological diagnosis confirmed the suspicion of squamous cell carcinoma with regional lymph node metastasis. Surgical treatment was effective, with favorable prognosis.

Keywords: equino; neoplasia; tumor.

Palavras-chave: equine; neoplasm; tumor.

Introdução - As afecções dermatológicas se tornam cada vez mais frequentes na rotina da medicina equina, afetando o desempenho ou a capacidade reprodutiva, a prática de esportes desenvolvidos pelo animal e ocasionando defeitos estéticos. As neoplasias da região do prepúcio e pênis são frequentes. A região despigmentada, desprovida total ou parcialmente de pelose a idade avançada são fatores que auxiliam no aparecimento de neoplasias e os sin-

¹ Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

² Setor de Clínica Cirúrgica de Grandes Animais, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

tomas se agravam com o efeito da radiação solar [1, 2]. Há também indícios de que o esmegma prepucial teria potencial carcinogênico, estando de acordo com a possível gênese desta doença [2].

Vários são os tipos de neoplasias comumente encontradas, entre as quais merecem destaque, devido à maior incidência, o sarcoide, fibrossarcoma, melanoma, carcinomas e granulomas. [3]. As neoplasias de equinos machos são essencialmente limitadas às dos testículos, do pênis e prepúcio e o de maior ocorrência é o carcinoma de células escamosas (CCE), também denominado carcinoma espinocelular (CEC), que afeta principalmente prepúcio e pênis [2]. Tanto garanhões como cavalos castrados desenvolvem carcinoma de células escamosas [4].

O CCE se caracteriza por lesões extensas, localmente invasivas, envolvendo tanto o prepúcio quanto o pênis. Eles demoram a metastatizar, mas se espalham para os linfonodos regionais e depois para o pulmão [2]. Particularmente nos equinos, essa neoplasia tem se destacado entre as alterações que requerem tratamento clínico e cirúrgico e, dependendo da localização, estágio, idade e da atividade que o animal desempenha, pode acarretar prejuízos consideráveis aos criadores [5].

O sinal clínico observado inicialmente é a dermatose solar. Com a evolução da neoplasia se observa eritema, edema e descamação, seguidos de formação de crostas e adelgaçamento da epiderme e subsequente ulceração. Embora ocorra crescimento de massas exofíticas, o padrão da neoplasia é crescimento infiltrativo [4]. O presente trabalho teve como objetivo relatar um caso de carcinoma de células escamosas no prepúcio de um cavalo da raça quarto de milha.

Relato de Caso - Foi atendido na clínica cirúrgica de grandes animais, do Hospital Veterinário da Universidade Federal da Bahia (HOSPMEV-UFBA), um equino, macho, castrado, da raça Quarto de Milha, pelagem alazã amarela, com 12 anos de idade e 460 kg. O proprietário relata na anamnese que adquiriu o animal há um ano e meio e tem contato com o mesmo três vezes por semana. Relata que observou aumento de volume na região do prepúcio e fez tratamento com anti-inflamatório e antibiótico, mas após um ano voltou a aparecer o aumento de volume na região. Também relatou que fez aplicação de dexametasona (5mL) há dez dias, mas não ocorreu melhora. O animal vive estabulado, recebendo água e suplementação mineral à vontade e meio fardo de feno por dia.

Ao exame clínico geral, o animal se apresentava ativo, em bom estado nutricional, sem alteração dos parâmetros fisiológicos. Ao exame clínico específico observou-se aumento de volume na região do prepúcio, com textura bastante firme, causando incapacidade em expor o pênis, ulcerações na cavidade prepucial e desconforto ao urinar. Não apresentava alterações em outros sistemas.

Foi prescrito o tratamento com anti-inflamatório e antibiótico, ducha de 15 minutos na região do prepúcio, curativo e caminhadas diárias de 15 minutos, até que ocorresse a diminuição do edema. O curativo era realizado fazendo-se a higienização do prepúcio e pênis

com clorexidinadegermante (5%) e Tergenvet (28%). Foram solicitados exames complementares: hemograma e bioquímico, os quais apenas revelaram uma anemia considerável.

O animal foi acompanhado no hospital veterinário e no décimo dia de internamento apresentou estrangúria. À palpação retal foi diagnosticada intensa retenção urinária e por esse motivo foi conduzido para cirurgia recebendo medicação pré-anestésica composta de 0,08mg/kg de xilazina e 2mg/kg de meperidina. Para indução anestésica foi utilizado cetamina (2mg/kg) e isofluorano para manutenção.

Devido ao risco de ruptura de vesícula urinária, optou-se em realizar primeiramente a uretostomia perineal, seguida pela penectomia. Com a obstrução uretral, não foi possível introduzir uma sonda uretral pelo pênis, para assim, identificar melhor a uretra perineal. Com o equino em decúbito dorsal, foi realizada uma incisão na linha média, entre o escroto e o ânus, aproximadamente na altura das asas do ísquio. Foi dissecado e rebatido o músculo retrator peniano, separado os músculos bulboesponjosos para expor o corpo esponjoso e incizou-se até atingir o lúmen uretral. Neste momento, realizou-se a introdução de sonda uretral e esvaziamento da bexiga. A mucosa uretral foi suturada na pele por pontos simples separados, utilizando vicril 2-0. Em seguida, iniciou-se a penectomia com uma incisão elíptica na pele, circundando completamente o prepúcio e pênis, fazendo a hemostasia dos vasos utilizando fio categut 0. O pênis e o prepúcio foram divulsionados e separados caudalmente do abdômen, realizando em seguida a amputação peniana, e deste modo, excisando todo prepúcio e pênis. Ao realizar a amputação do pênis, colocou-se a túnica albugínea justaposta ao coto amputado, além de fixar o mesmo na parede abdominal. A hemostasia foi realizada por ligadura, circundando o pênis caudalmente ao local da amputação utilizando fio poliglactina 1, além de ligar isoladamente os vasos mais calibrosos com categut 0. A síntese do tecido subcutâneo foi realizada buscando reduzir ao máximo o espaço morto, principalmente na área próximo ao coto a fim de diminuir o processo inflamatório e promover uma cicatrização mais rápida. Para isso, realizou-se pontos simples separados, seguido por sutura intradérmica, utilizando fio poliglactina 1. Ao final, fez-se a sutura de pele com fio polipropileno 2 e padrão de sutura Wolf.

No pós-cirúrgico foi administrado ceftiofur sódico (3mg/kg) e fenilbutazona (2,5mg/kg). A limpeza da ferida foi realizada diariamente com clorexidina a 2%, fazendo compressa de açúcar durante 10 minutos e aplicação de spray repelente.

Foi coletado um fragmento da região do prepúcio para realização do diagnóstico histopatológico, que evidenciou proliferação de células epiteliais atípicas, intensamente pleomórficas com núcleos arredondados a ovóides, levemente cromáticos. Verificaram-se diversas formações de “pérolas córneas”, focos de diferenciação escamosa e intensa desmoplasia. Figuras de mitoses eram relativamente frequentes e a neoplasia apresentou caráter invasivo aos planos profundos. Adicionalmente, verificaram-se linfonodo regional com perda da arquitetura histológica devido à obliteração da superfície nodal por intensa proliferação células neoplásicas com as mesmas características histológicas da região prepucial, concluindo o diagnóstico de carcinoma de células escamosas com metástase para linfonodo regional.

Resultados e Discussão - Estudos retrospectivos demonstram uma alta incidência de tumores cutâneos no Rio Grande do Sul, com 77,6% das 315 amostras analisadas[6], resultados muito parecidos com os de Sprenger *et al.* (2014) no Paraná, que das 201 amostras de biopsias de pele de equinos, 82,6% eram de tumores cutâneos. Esses trabalhos demonstram que essas neoplasias estão entre as mais frequentes nesta espécie em algumas regiões do Brasil.

Assim como no trabalho de Gueiros Silva *et al.* (2015) o animal do presente relato também era um equino castrado, fator que propicia menor exposição da parte livre do pênis e consequentemente maior acúmulo de esmegma no interior da cavidade prepucial. Esse seria uma hipótese para o desenvolvimento da neoplasia. Bataier *et al.* (2012) classifica o CCE como uma neoplasia agressiva, que causa grande injúria ao animal, apresentando eritema, edema, descamação e ulcerações da epiderme, similar ao caso relatado.

Dentre os problemas que dificultam o prognóstico da neoplasia, a metástase é uma grande preocupação quando se avalia cavalos com CCE da genitália externa e ela ocorre em 10-15% dos casos e podem afetar também glândulas salivares, tórax, pulmão, baço e fígado [8].

Considerações Finais - Apesar do diagnóstico de CCE com metástase em linfonodo regional, no presente caso relatado, o tratamento cirúrgico foi efetivo e o prognóstico foi favorável, melhorando a qualidade de vida ao animal.

Referências Bibliográficas

- [1] BATAIER M. N., ALVES R. M., ZANATTA J. C., BORALLI I. C., MOSQUINI A. F., MONTANHA F. P. Carcinoma de células escamosas em prepucio de equino – relato de caso. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**. ano IX, número 18, Janeiro de 2012.
- [2] EDWARDS J. F. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. **Animal Reproduction Science**. v.107, p.197–207 (2008).
- [3] BARRELET, A.; FOOTE, A; LITTLEWOOD, J.D. Common equine skin tumours. **Companion Animal**, v.15, p.9-17, 2010.
- [4] FOSTER, R.A. Male Reproductive System. In: McGAVIN, M.D. & ZACHARY, J.F. (eds.). **Pathology Basis of Veterinary Disease**. 4 ed., cap.19, p. 1344-1347, 2007.
- [5] RABBERS A. S., RABELO R. E., VULCANI V. A. S., SANT'ANA F. J. F., LIMA C. R. O., SILVA L. A. F. Diagnóstico clínico, laboratorial e tratamento cirúrgico do carcinoma de células escamosas no genital de equinos machos: relatos de dois casos. **Revista brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 12-18, fevereiro 2014.
- [6] SOUZA T.M., BRUM J.S., FIGHERA R.A., BRASS K.E. & BARROS C.S.L. Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v 31 pag. 379-382, maio 2011.
- [7] SPRENGER L. K., GABARDO L. B., RISOLIA L. W., MOLENTO M. B., SILVA A. W. C., SOUSA R. S. Frequência de neoplasias cutâneas em equinos: estudo retrospectivo do laboratório de patologia veterinária da universidade federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.3, p.81-86, 2014.
- [8] GUEIROS SILVA S. C., ALVES A. de D. FRÖNNAU M., TORRES M. B. M. Carcinoma de células escamosas em equino com metástase pulmonar: Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.9, n.4, p. 689-698, 2015.

Avaliação da compactação do DNA espermático em sêmen bubalino

Ana Júlia Mota de Lima¹
anajuliamotadelima@gmail.com

Arnaldo Algaranhar Gonçalves¹

Carlos Vinícius da Silva Nascimento²

Diego Fernando Dubeibe Marin¹

Anelise de Sarges Ramos³

Eduardo Baía de Souza¹

Simone do Socorro Damasceno Santos¹

Nathália Nogueira da Costa¹

Otávio Mitio Ohashi¹

Thiago Velasco Guimarães Silva¹

Abstract: Damage to the genetic material can impair the processes of fertilization and embryonic development. The objective of this work was to evaluate the existence of individual variation among bulls. Frozen semen of 5 animals was used for chromomycin staining. Spermatozoa previously selected by Percoll gradient centrifugation were incubated with 200 μ l of chromomycin (0.25 mg / ml) at 37 ° C for 30 minutes. Previous to the evaluation the dye Hoescht was added for the nuclear marking. Positive control consisted of pre-incubated spermatozoa in dithiothreitol solution (200 mM). The results were analyzed with ANOVA ($p \leq 0.05$) in the SIGMAPLOT program. There was a significant difference between bull B (11.4 ± 5.85) and bull E (40.6 ± 10.5). There was no significant difference between the other bulls. The results demonstrated that there may be an individual variation in the number of sperm cells with protamine deficiency.

Keywords: Buffalo; CMA3; Chromatin; Spermatozoa.

Palavras-chave: Búfalo; CMA3; Cromatina; Espermatozoide.

Introdução - O Brasil é detentor do maior rebanho bubalino das Américas, sendo que o estado do Pará possui o maior do país com 508 mil cabeças de um rebanho nacional de 1,3 milhões, isso proporciona uma atenção maior para a atividade no setor agropecuário e, com isso, o uso de biotecnologias da reprodução tem crescido exponencialmente tanto na inseminação artificial em tempo fixo quanto na produção de embriões *in vitro*. [1]. A realização de pesquisas buscando melhorias nestas áreas é essencial e dentre elas destaca-se a qualidade

¹ Laboratório de Fertilização *in vitro* – Universidade Federal do Pará

² Médico Veterinário - Coordenador da área pecuária na empresa Bubras.

³ Setor de Reprodução Animal – Universidade Federal Rural da Amazônia.

do sêmen, a fim de diminuir falhas reprodutivas e melhorar geneticamente os rebanhos brasileiros [2]. A qualidade do embrião está relacionada, entre outras coisas, com o sucesso da etapa de fecundação *in vitro* que depende, em parte, da integridade do DNA espermático. Falhas nesta etapa podem estar relacionadas com a má fragmentação do DNA, empacotamento anormal da cromatina e deficiência de protamina, dentre outros defeitos [3,4]. Antes da meiose, a cromatina no núcleo do espermátócito encontra-se espalhada e as proteínas predominantes nesta fase são as histonas, que aumentam o volume da cromatina [5, 6]. Porém, quando a espermiogênese (fase final da espermatogênese) se inicia, a maioria das histonas é substituída por protaminas [5]. E é esta presença de protaminas que confere um estado de hipercondensação ao DNA espermático, tornando o espermatozoide compacto, estável, com formato hidrodinâmico propício à motilidade e à penetração no oócito e difícil dissociação [5, 7, 8]. Esta organização protege o genoma paterno durante o transporte através do trato reprodutivo do macho e da fêmea garantindo a chegada ao sítio de fertilização e encontro com oócito [6]. Para analisar o nível de protaminação no espermatozoide, usa-se a técnica de coloração por Cromomicina A3, técnica esta relativamente recente realizada primeiramente por Simões et al. (2009) [9]. Dessa forma, a hipótese desse trabalho é que a redução da protaminação pode interferir na compactação do DNA espermático e, conseqüentemente, na qualidade dos embriões produzidos *in vitro*.

Material e Métodos - Foram utilizados no experimento sêmen criopreservado, na central de congelamento de sêmen Novagen, de cinco touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) adultos da raça Murrah. Cada partida por touro possuía cinco palhetas onde foram realizadas as repetições para avaliar a desprotaminação da cromatina espermática. O método de separação dos espermatozóides (SPTZ) dos crioprotetores e plasma seminal foi o de gradiente de densidade descontínuo de Percoll. A palheta fina (250 µl) de sêmen foi descongelada em água a 35 °C durante 30 segundos e, em seguida, o sêmen foi depositado sobre a coluna de 800µL de Percoll (400µL gradiente 90% e 400µL de PBS) e centrifugado a 800 g durante 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de 200µl lavado em 1ml de meio de PBS por centrifugação a 200 g durante 3 minutos para remoção dos resíduos de Percoll. Em seguida, um novo *pellet* de 50µl foi retirado e pré-incubado com a mesma quantidade de NaCl a 37°C por 15 minutos. Após esse período os espermatozoides foram incubados com 200µl da solução de Cromomicina (0,33 mg/ml) a 37°C, protegida da luminosidade durante 30 minutos. Em seguida, o corante Hoescht foi adicionado (3µl) e a solução continuou incubando nas mesmas condições citadas acima por mais 5 minutos. Por último, os espermatozoides foram lavados em 1ml de PBS e centrifugado a 200 g por 3 minutos, em seguida, foi preparado a lâmina para análise no microscópio de fluorescência e contabilizados 500 espermatozoides. Os dados foram comparados por médias pelo teste Tukey, utilizando o programa Sigma Plot com nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão - Houve diferença significativa na desprotaminação da cromatina espermática entre o Touro 2 (11,4 ±5,85) em relação ao Touro 5 (40,6 ±10,5). Não houve diferença significativa entre os demais touros. Sugestiona-se que o Touro 5 possui uma falha

molecular na espermatogênese, que realiza a substituição das nucleoproteínas histonas pela as proteínas de transição até a protamina durante a espermiogênese (fase de diferenciação das espermátides) resultando em uma estrutura altamente compacta de cromatina e protaminas [10]. Love et al. (2002) [11] associaram a susceptibilidade à desnaturação da cromatina espermática ao estágio da espermatogênese em que as células sofreram estresse por calor, correlacionando a estabilidade do complexo DNA-protaminas ao estresse térmico. Os resultados demonstraram que pode existir uma variação individual quanto ao número de células espermáticas que apresentam deficiência de protaminas, sugerindo que falhas no processo de compactação da cromatina espermática são ocasionadas durante a espermatogênese.

Considerações Finais - Os resultados sugerem que pode haver uma variação individual entre os touros da mesma espécie bubalina e isso pode contribuir como marcador de qualidade seminal ou diagnóstico clínico para infertilidade ou subinfertilidade.

Referências Bibliográficas

- [1] ABD-ALLAH, S. M. In vitro fertilization in buffaloes: A review. **J Buffalo Sci**, v. 4, p.11-14, 2015.
- [2] GONZALEZ, R. A. F. Efeito da criopreservação utilizando diferentes técnicas de congelamento e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e integridade de membranas do espermatozóide bovino. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo. Pirassununga. 2004. 94p.
- [3] CHO, C.; JUNG-HA, H.; WILLIS, W. D.; GOULDING, E. H.; STEIN, P.; XU, Z.; SCHULTZ, R. M.; HECHT, N. B.; EDDY, E. M. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. **Biol Reprod**, v.69, n.1, p.211-217, 2003.
- [4] FATEHI, A. N.; BEVERS, M. M.; SCHOEVERS, E.; ROELEN, B. A. J.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **J Androl**, v. 27, p. 176-188, 2006.
- [5] BALHORN, R. Sperm Chromatin: an overview. In: ZINI, A. & AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1ª ed., USA, Springer, 2011. Cap. 1, p. 3-18.
- [6] SHARMA, R.; AGARWAL, A. Spermatogenesis: an overview. In: ZINI, A.; AGARWAL, A. **Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction**. 1ª ed., USA, Springer, 2011. Cap. 2, p. 19-44.
- [7] BREWER, L.; CORZETT, M.; BALHORN, R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. **J Biol Chem**, v. 277, p. 38895-38900, 2002.
- [8] DADOUNE, J. P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microsc. Res. Tech.**, v. 61, p. 56-75, 2003.
- [9] SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; DE BARROS, F. R. O.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. **Biotech Histochem**, v. 84, p. 73-79, 2009.
- [10] GIWERCMAN, A.; SPANO, M.; LA HDETIE, J.; BONDE, J. P. E. Quality assurance of semen analysis in multicenter studies. **Scand J Work Environ Health**, v. 25 (Suppl 1), p. 23-5, 1999.
- [11] LOVE, C.C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 1135-1142, 2002.

Anormalidades morfológicas e danos no DNA espermático em touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) submetidos à insulação testicular

Arnaldo Algaranhar Gonçalves¹
algaranhar.vet@gmail.com

Diego Fernando Dubeibe Marin¹

Thiago Velasco Guimarães Silva¹

Ana Júlia Mota de Lima¹

Mauro Andrey Rodrigues Morais¹

Eduardo Baia de Souza¹

Dayana Neves de Melo²

Sebastião Tavares Rolim Filho²

Alexandre Rossetto Garcia³

Otávio Mitio Ohashi¹

Abstract: The aim was to understand the performance of testicular thermal stress on the morphology, compaction and integrity of DNA in the different phases of the spermatogenic cycle in buffaloes, using chromomycin A3 and acridine orange respectively. Five adult bulls undergoing testicular insulation for 48 hours and semen collected once every seven days, divided into pre and post testicular insulation. The post-insulation testicular temperature increased 3.2°C ($p < 0.05$) in relation to the control. There was an increase ($p < 0.05$) in the deprotamination of the spermatic chromatin in the seventh week after insulation compared to the control (11.0 \pm 3.1 and 3.0 \pm 2.8), but there was no difference in DNA fragmentation after insulation. However, head defects showed an increase ($p < 0.05$) in the seventh week in relation to the control (0.7 \pm 0.2 and 0.13 \pm 0.16). Therefore, the increase in testicular temperature in buffaloes had a negative influence on spermatogonia and primary spermatocytes on chromatin protamination.

Keywords: Chromatin; Fragmentation; Protamine.

Palavras-chave: Cromatina; Fragmentação; Protamina.

Introdução - As condições climáticas desfavoráveis exercidas pela elevada temperatura, associada à alta umidade relativa do ar influenciam negativamente a capacidade reprodutiva dos animais de corte ou leite [1]. Na bubalinocultura existe um diminuto entendimento quanto à ação do estresse térmico sobre o epitélio seminífero e o epidídimo, e sua consequência na morfologia espermática e alterações no seu DNA. Em bovinos [2], foi demonstrado que o aumento da temperatura testicular exerceu efeito deletério nas diferentes fases da espermatogênese, in-

¹ Laboratório de Fertilização *in vitro* - Universidade Federal do Pará.

² Setor de Reprodução Animal - Universidade Federal Rural da Amazônia.

³ Embrapa Pecuária Sudeste

duzindo aumento na incidência de patologias espermáticas, principalmente de cabeça e, dessa forma, diminuindo a qualidade do sêmen. Esta interferência ambiental, como estresse térmico, pode também, alterar processos moleculares, aumentando as espécies reativas do oxigênio que causam apoptose e fragmentação do DNA, além de deficiências durante a troca da histona pela protamina na cromatina [3], essencial para a entrega do genoma paterno, pois além de proteger o DNA executa o *gene imprinting* e regulações epigenéticas [4]. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do estresse térmico testicular sobre as características de morfologia, compactação e integridade do DNA, nas diferentes fases do ciclo espermatogênico em bubalinos.

Material e Métodos - Cinco touros bubalinos (*Bubalus bubalis*) adultos da raça Murrah foram utilizados no experimento. As coletas de sêmen foram realizadas a cada sete dias, divididas em quatro coletas pré e nove coletas pós insulação testicular, utilizando vagina artificial. A insulação testicular foi realizada por uma bolsa impermeável fixada na região escrotal durante 48 horas. Aferição da temperatura da pele testicular foi realizada com termômetro clínico seis vezes na pré insulação, 24 e 48 horas durante a insulação e três vezes por semana no pós insulação. A avaliação da morfologia espermática foi realizada com microscópio de contraste de fase (1000X) e classificadas de acordo com Bloom (1973). Para avaliação da deficiência de protamina, as células espermáticas foram marcadas utilizando o corante fluorescente cromomicina (CMA3) [7]. A fragmentação do DNA foi detectada utilizando a técnica de coloração por acridina laranja [8]. As lâminas foram lidas em microscópio de fluorescência. Os dados foram comparados por médias pelo teste Tukey, utilizando o programa estatístico SAS 9,0. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão - A temperatura testicular após a insulação, aumentou 3,2 °C ($p < 0,05$) em relação à temperatura controle, desestabilizando a temperatura fisiológica para o adequado processo de espermatogênese (Tabela 1). Houve elevação significativa ($p < 0,05$) para a desprotaminação da cromatina na sétima coleta de sêmen após a insulação, confirmando que as espermatogônias, no momento da insulação tiveram falhas na fase mitótica para duplicação do DNA ou na primeira meiose, onde os espermatócitos primários iniciam o processo de troca das histonas com a quebra do DNA pela enzima topoisomerase II durante a substituição das proteínas de transição não histonas (TPs) pelas protaminas [8]. Esses resultados contrastam com o Rahman et al. (2014) [7], que insularam touros bovinos de raças taurinas por 48 horas e avaliaram a desprotaminação espermática, e observaram médias mais elevadas de defeitos de cabeça na quarta semana após a insulação testicular, fase em que os espermatozoides estariam mais avançados na divisão meiótica ou até no início do processo de espermiogênese. Isso indica que as espermatogônias dos bubalinos são mais susceptíveis a dano pelo calor que em bovinos.

No teste de fragmentação do DNA, não foi verificada diferença na integridade do DNA após a insulação testicular. Estudo de Kazerooni et al. (2009) [9] não demonstrou diferença significativa quando a fragmentação do DNA foi avaliada pela técnica de acridina laranja em espermatozoides humano com baixa fertilidade e histórico de aborto nas esposas. Já ava-

liação da desprotaminação mediante CMA3 resultou diferença ($p < 0,05$), concluindo que a falha na troca de histona para protamina ou o inverso tem maior relação com a concepção e abortos espontâneos.

Tabela 1 – Média e desvio padrão de acordo com o tempo de coleta seminal de touros bubalinos submetidos a 48 horas de insulação testicular, avaliando a temperatura testicular, desprotaminação do DNA, fragmentação do DNA do espermático e a morfologia com o defeito de cabeça.

| Tempo | Temperatura Testicular (°C) | CMA3 (%) | AL (%) | Defeitos de Cabeça (%) |
|------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Controle | 32,0 ± 0,8 ^B | 3,0 ± 2,8 ^B | 3,8 ± 4,7 ^{NS} | 0,13 ± 0,16 ^B |
| Insulação | 35,2 ± 2,0 ^A | * | * | * |
| 1º Pós Insulação | 33,5 ± 0,6 ^{ABC} | 2,8 ± 0,6 ^B | 4,5 ± 4,0 ^{NS} | 0,06 ± 0,08 ^B |
| 2º Pós Insulação | 33,7 ± 0,6 ^{ABC} | 3,9 ± 4,2 ^{AB} | 3,3 ± 2,6 ^{NS} | 0,02 ± 0,04 ^B |
| 3º Pós Insulação | 33,4 ± 0,2 ^{ABC} | 6,2 ± 3,9 ^{AB} | 8,1 ± 7,8 ^{NS} | 0,3 ± 0,3 ^{AB} |
| 4º Pós Insulação | 32,1 ± 0,4 ^{BC} | 9,3 ± 8,9 ^{AB} | 2,8 ± 3,7 ^{NS} | 0,3 ± 0,3 ^{AB} |
| 5º Pós Insulação | 32,9 ± 0,5 ^{BC} | 7,3 ± 4,0 ^{AB} | 4,4 ± 3,7 ^{NS} | 0,3 ± 0,1 ^{AB} |
| 6º Pós Insulação | 33,6 ± 0,5 ^{ABC} | 5,6 ± 3,5 ^{AB} | 8,0 ± 5,1 ^{NS} | 0,2 ± 0,2 ^{AB} |
| 7º Pós Insulação | 33,5 ± 0,5 ^{ABC} | 11,0 ± 3,1 ^A | 8,1 ± 1,4 ^{NS} | 0,7 ± 0,2 ^A |
| 8º Pós Insulação | 33,0 ± 1,0 ^{BC} | 8,1 ± 4,2 ^{AB} | 6,5 ± 6,4 ^{NS} | 0,4 ± 0,4 ^{AB} |
| 9º Pós Insulação | 33,1 ± 1,1 ^C | 10,7 ± 5,9 ^{AB} | 7,1 ± 8,3 ^{NS} | 0,3 ± 0,07 ^{AB} |

Valores com letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna diferem significativamente (A-C, $P < 0,05$). CMA3: Técnica de Cromomicina A3, avaliar desprotaminação do DNA espermático; AL: Técnica de Acridina laranja, avaliar fragmentação do DNA espermático; NS: não significativo; *: ausentes.

O estresse térmico testicular também provocou um aumento gradativo nos defeitos de cabeça espermática, sendo que na sétima semana após a insulação houve diferença ($p < 0,05$) comparada ao controle. Esta influência foi decorrente principalmente no aumento das patologias de cabeça piriforme e cabeça grande, curta ou larga. Segundo Enciso et al. (2011) [3], os estudos realizados que exploram a relação entre morfologia espermática e parâmetros de danos no DNA ainda são controversos, no entanto afirmam que falhas no processo de reparos durante as quebras das torções do DNA, para a troca das proteínas nucleares, resultam em morfologias espermáticas anormais. Dessa forma, é possível inferir que o estresse térmico não ocasionou altos danos na morfologia dos espermatozoides, porém foi capaz de causar danos nas proteínas nucleares da cromatina espermática.

Considerações Finais – Aumento na temperatura testicular em búfalos influenciou negativamente no desenvolvimento das espermatogônias e dos espermátócitos primários, tanto na morfologia quanto na protaminação da cromatina. São necessários estudos complementares para esclarecer a relação da fragmentação do DNA com a morfologia espermática.

Referências Bibliográficas

[1] GARCIA, A. R. Conforto térmico na reprodução de bubalinos criados em condições tropicais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37, n.2, p.121-130, 2013.

[2] GABALDI, S. H.; WOLF, A. A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciê. Agr. Saúde.**, v.2, n.2, p.66-70, 2002.

[3] ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. **Theriogenology**, v.76, p. 23-32, 2011.

[4] HUTCHISON, J. M.; RAU, D. C.; DEROUCHÉY, J. E. Role of disulfide bonds on DNA packaging forces in bull sperm chromatin. **Biophys. J.**, v.113, n.7, p. 1925-1933, 2017.

[5] SIMÕES, R.; FEITOSA, W. B.; MENDES, C. M.; MARQUES, M. G.; NICACIO, A. C.; DE BARROS, F. R. O.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Use of chromomycin A3 staining in bovine sperm cells for detection of protamine deficiency. **Biotechnic & Histochemistry**. v. 84, n. 3, p. 79-83, 2009.

[6] UNANIAN, M. M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

[7] RAHMAN, M. B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T., 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.

[8] RAHMAN, M. B.; KAMAL, M. M.; RIJSSELAERE, T.; VANDAELE, L.; SCHAMSUDDIN, M.; VAN SOOM, A. Altered chromatin condensation of heat-stresses spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. **Reprod Fertil Dev**. v. 26, n.8, p. 1107-16, 2014.

[9] KAZEROONI, T.; ASADI, N.; JADID, L.; KAZEROONI, M.; GHANADI, A. Evaluation os sperm chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. **J Assist Reprod Genet**. v. 26, p. 591-596, 2009.

Agradecimentos: À CAPES pela concessão de bolsa de estudos. O CNPq pelo projeto nº 480100/2013-6 para o financiamento dos reagentes.

Novo protocolo para colheita de sêmen em crocodilianos

Mónica Madrigal-Valverde^{1,2}
madrigalvalverdem@gmail.com

Olivier Castro Morales²

Anthony Valverde²

Stephen Jonhston³

Arnoldo Gadea Rivas²

Macon Pereira Lents¹

Abstract: The new protocol for crocodilian semen collection: Actually, the individuals of the order Cocodylia are in danger of extinction or vulnerability situation. The study of the reproduction of the reptiles is incipient; it required the correct selection and classification of gametes in assisted reproduction programs. In this context, the research in assisted reproduction future projects is an opportunity for the reproduction of individuals with physical limitations to mating. In the years 2014-2015 a new protocol for semen collection was developed, during the first experiments, if the American crocodile and alligator were anatomically examined in vivo, in 2016 sperm material was collected from 4 animals checks for volume and pH. The protocol without pharmacological contention with careful physical restraint was satisfactory. The development of techniques for semen collection in vivo from wild species, through a non-risk analgesic procedure, facilitates and improves the processes of study and use in conservation programs.

Keywords: Alligator; Andrology; Reproduction.

Palavras-chave: Jacaré; Andrologia; Reprodução.

Introdução - O crocodilo americano (*Crocodylus acutus*) e o jacaré (*Caiman crocodilus*) pertencem a ordem Crocodylia. A distribuição do crocodilo americano se estende desde a península de Yucatán [1] até América do Sul, reportado no Equador [2]. Entretanto, o território do jacaré na América continental vai desde o sul da Florida nos Estados Unidos até o centro do Brasil [3] [4] [5]. Atualmente muitas espécies de crocodilianos encontram-se em perigo de extinção. Na República da Costa Rica o manejo e uso das espécies silvestres é regulado pela Lei de Conservação da Vida Silvestre N° 7317, esta lei define a aplicação dos conhecimentos obtidos na pesquisa do ambiente e populações silvestres, com a finalidade da conservação e utilização sustentável *in situ* e *ex situ*. Um dos aspectos de maior vulnerabilidade é manter e incrementar as informações sobre as populações em risco de extinção. Um maior conhecimento morfofisiológico das espécies, vai facilitar a abordagem e triagem das populações que apresentam problemas [3] sendo

¹ Universidade Federal da Bahia, Brasil

² Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica

³ Queensland University, Australia

a reprodução destes animais um eixo fundamental para a conservação dos mesmos. A análise e preservação de material seminal é um aspecto de importância nas perspectivas para o desenvolvimento de técnicas para a inseminação artificial das fêmeas. A técnica de colheita de sêmen de crocodilianos pode ser realizada por aspiração da cauda epidídimo [6], mediante o uso de cateteres uretrais [6] [7] [8], uso de eletroejaculação [8] e através da recente técnica de massagem manual, utilizando protocolo de imobilização e sedação farmacológica [7] [8]. O desenvolvimento de técnicas para a coleta de sêmen e seu processamento contribui para uma maior compreensão dos aspectos reprodutivos em crocodilianos e potencializam sua futura aplicação na conservação das populações em risco. Atualmente, a pesquisa básica é necessária para estabelecer protocolos para a coleta de material genético, garantindo a proteção dos espécimes e causando o mínimo de perturbação e estresse aos animais, favorecendo a harmonia de acordo com a jurisprudência de cada nação. Portanto, o objetivo deste experimento foi desenvolver um protocolo de coleta de sêmen em crocodilianos sem o uso de contenção farmacológica.

Material e Métodos - O estudo foi desenvolvido nas instalações de exibição de crocodilos e jacarés, pertencente ao Programa de ecoturismo científico (ECOTEC) da Escola de Agronomia do Instituto Tecnológico da Costa Rica (ITCR), localizado em Santa Clara, Florença, San Carlos, Alajuela, Costa Rica. A instalação está localizada a uma altitude de 120 metros acima do nível do mar, de acordo com dados registrados na Estação Meteorológica 069567 St Clara na área do campus do ITCR registrado nos últimos seis anos, com temperatura mínima de 21,7° C e temperatura máxima de 30,7° C, umidade relativa do ar de 88,5%, e taxa de precipitação de 3321,1 mm de chuva ao ano. O período de estudo é compreendido entre outubro de 2014 até abril 2016. Com a captura e manipulação dos animais (uma ou ambas as espécies) nos meses de outubro de 2014, outubro de 2015, fevereiro de 2016 e abril de 2016. O Programa EcoTec é classificado como zoológico não comercial e local de conservação *ex situ*, de animais de acordo com a diretriz da Lei N° 7317 da República da Costa Rica. No presente trabalho, foram utilizados espécimes sexualmente maduros, com comprimentos (cabeça até a cauda) entre 315 cm e 390 cm (*Crocodylus acutus*) com peso inferior aos 200 kg, nas coletas realizadas, em *Caiman crocodilus* os animais apresentavam comprimento total de 72 a 77 cm e peso entre 12 e 14,2 kg. Durante o experimento foram utilizados cinco machos de *Crocodylus acutus* e quatro de *Caiman crocodilus* para padronização da metodologia de contenção. Dois indivíduos de cada espécie *Crocodylus acutus*, *Caiman crocodilus*, foram utilizados para a coleta de sêmen. O comportamento reprodutivo dos crocodilos está associado ao acasalamento nos meses outubro até janeiro, os ovos são depositados pelas fêmeas e a incubação ocorre entre os meses de janeiro e abril com nascimentos durante o período de maio a setembro; entretanto o jacaré tem comportamento de acasalamento nos meses de fevereiro a junho, a incubação dos ovos acontece de junho até setembro, e os nascimentos ocorrem de setembro até dezembro. Para a captura dos animais foram usadas as técnicas de [5] adaptadas com base no conhecimento regente da equipe. O tempo total de manuseio do animal não ultrapassou 30 minutos por indivíduo. O procedimento foi realizado sem aplicação de drogas para sedação ou ejaculação dos animais, neste procedimento o animal foi contido pela equipe do experimento, com monitoração do seu comportamento, favorecendo o bem-estar e segu-

rança dos animais e pesquisadores. A colheita de sêmen procedeu-se introduzindo uma mão enluvada pela cloaca, posteriormente foi realizada massagem de acordo com [8]. O sêmen foi coletado em tubos de 15 ml ou micro tubos de 1,5 ml, e diluído em solução PBS 1:1. O Ph do material foi aferido por fitas reagentes (Sigma-Aldrich), uma gota de sêmen foi observada ao microscópio para verificação da presença espermática.

Resultados e Discussão - Em animais fora da época de acasalamento, foi localizado o pênis, o sulco peniano, e o ponto de massagem, mediante resposta de ereção do pênis foi coletado qualquer fluido oriundo do sulco peniano. Em animais em época de acasalamento, a resposta à estimulação foi obtida com início do gotejamento de sêmen na região do sulco peniano, o gotejamento foi observado por no máximo cinco minutos. O pH encontrado apresentava-se perto da neutralidade, indicando a não contaminação com urina. Nos fluidos coletados de indivíduos durante o período de 2014-2015, não foram encontrados espermatozoides. No entanto, a prática de coleta de sêmen em animais fora da estação de acasalamento permitiu a padronização das técnicas de captura e imobilização dos animais, bem como a técnica de manipulação do animal para a coleta seminal. Durante o processo de coleta, o animal apresenta movimento do pênis nos primeiros minutos de estimulação, seguido do aparecimento de gotas de sêmen ao longo do sulco peniano. Os exemplares de *Crocodylus acutus* ejacularam entre 1 e 1,5 ml, com presença confirmada de espermatozoides, nos fluidos coletados de *Caiman crocodilus* também foram encontradas células espermáticas, esses indivíduos ejacularam menos de 0,1 ml. O volume do ejaculado coletado nos indivíduos da espécie *Crocodylus acutus*, concorda com o descrito [8], utilizando a técnica de massagem manual, em *Crocodylus porosus* [7] ao trabalhar com *Crocodylus intermedius* realizando coletas por meio de um cateter uretral. Nos jacarés o volume dos ejaculados foi abaixo de 0,1 ml, fato que corrobora os resultados obtidos [6] para essa espécie, o volume do sêmen do jacaré, pode ser influenciado pelo tamanho dos indivíduos. A eliminação do uso de fármacos permitiu a imediata incorporação dos animais às instalações, após as coletas e foi observado que os indivíduos não apresentavam impossibilidade de movimentação ou redução da agressividade.

Considerações Finais - O desenvolvimento de técnicas para coleta de sêmen de crocodilianos, através de procedimentos sem contenção farmacológica, favorecerá o potencial uso de biotecnologias da reprodução em programas de conservação das espécies.

Referências Bibliográficas

- [1] Charruau, P, Cedeño-Vazquez, JR, Köhler, G. Chapter 11: Amphibians and Reptiles. In ISLEBE et al., G.A. (Eds.). **Biodiversity and Conservation of the Yucatan Peninsula**. Cham, Suíça: Springer, 2015. p. 257- 293.
- [2] CARVAJAL, R.I.; SAAVEDRA, M.; ALAVA, J.J. Ecología poblacional, distribución y estudio de hábitat de *Crocodylus acutus* (Cuvier, 1807) en la "Reserva de producción de fauna manglares El Salado" del estuario del Golfo de Guayaquil, Ecuador. **Revista de Biología Marina y Oceanografía, Valparaíso**, Chile, v. 40 n. 2, p.141-150 dez. 2005.
- [3] CABRERA, F.J.; GARCÍA, G.C. Características anatómicas del aparato genital masculino del *Caiman crocodilus crocodilus*. **Rev. Fac. Cs. Vets. UCV**, Caracas, Venezuela, v. 45 n. 2, p. 55-63. 2004
- [4] CAMPOS, Z.; MAGNUSSON, W.E. Emergence behaviour of yacare caimans (*Caiman crocodilus yacare*) in the Brazilian Pantanal. **The Herpetological Journal**, Angus, Reino Unido, v. 21 n. 1, p.91-94. Jan. 2011

[5] HUCHZERMEYER, F.W. **Crocodiles**: Biology, Husbandry and Diseases. Cambridge, Reino Unido: CAB International, 2003, p.

[6] LARSEN, R. E.; VERDADE, L. M.; MEIRELLES, C. F.; LAVORENTI, A. Broad-nosed caiman (*Caiman latirostris*) semen collection, evaluation, and maintenance in diluents. In: **Crocodiles**. Proceedings of the 11th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, Vol 1. IUCN ; 1992, Gland, Suecia. The World Conservation Union, 1992. p.270-276.

[7] ROMERO-SOLÓRZANO, L.; ARDILLA-ROBAYO, M.; MORENO-TORRES, C.; JIMÉNEZ-ESCOBAR, C. Extracción y análisis de las características macroscópicas y microscópicas del semen de cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*). In: Mem. Conf. Interna. Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv; 2010, Pereira, Colombia. **Anais...** Pereira: 2010. Memorias de Conferencias Internas en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y no Convencional, 2010. p.48-58.

[8] JOHNSTON, S.D.; LEVER, J.; MCLEOD, R.; OISHI, M.; QUALISCHEFSKI, E.; OMANGA., et al. Semen collection and seminal characteristics of the Australian saltwater crocodile (*Crocodylus porosus*). **Aquaculture**. v. 422-423 n.1, p.25-35. feb. 2014

Agradecimentos - Os pesquisadores agradecem ao Programa EcoTec, pelo financiamento para a pesquisa e pela autorização de publicar os dados, além do agradecimento para a Pré reitoria de pesquisa do Instituto Tecnológico da Costa Rica, pelo apoio econômico para a assessoria do professor Stephen Jonhston.

Parâmetros reprodutivos de touros Nelore criados a pasto avaliados de 12 a 48 meses de idade

Vicente Otávio da Fonseca^{1,2}
vofonseca@hotmail.com

Clovis Franco Sousa²

Nílson Antonio de Azevedo³

Luigi Francis Lima Cavalcanti¹

Leticia Zoccolaro Oliveira¹

Gabriel Augusto Monteiro¹

Juliana Wilke Diniz Horta¹

Paloma Clemente Pinto da Silva^{1,4}

Ana Carolina Bahia Teixeira¹

Livio Ribeiro Molina¹

Abstract: This study aimed to demonstrate the effect of age on scrotal circumference (SC), pelage color and semen quality, from puberty to post sexual maturity. Data from 3039 breeding soundness evaluations of pasture raised Nelore bulls were used. Animals presented different age groups ranging from 12 to 48 months. Andrological examination and color of pelage (COR; 1-4) was recorded for each animal. Semen parameters, SC and COR varied ($P < 0.05$) according to age group: A) 12-18m: $COR = 1.45 \pm 0.64^a$, $SC = 31.63 \pm 3.51 \text{ cm}^a$, Total Motility (Mot) = $67.73 \pm 17.99\%^a$, Sperm defects (TDE) = $16.22 \pm 16.95\%^a$; B) 18-24m: $COR = 1.50 \pm 0.57^b$, $SC = 32.00 \pm 3.47 \text{ cm}^a$, $Mot = 69.60 \pm 29.13\%^a$, $TDE = 14.49 \pm 15.00\%^b$; C) 24-36m: $COR = 1.51 \pm 0.66^b$, $SC = 33.56 \pm 3.91 \text{ cm}^b$, $Mot = 69.46 \pm 15.52\%^a$, $TDE = 12.29 \pm 12.92\%^c$; D) 36-48m: $COR = 1.60 \pm 0.57^c$, $SC = 36.66 \pm 3.50 \text{ cm}^c$, $Mot = 71.04 \pm 16.19\%^b$, $TDE = 10.87 \pm 12.97\%^d$. It was concluded that age influences testicular size, pelage color and semen quality. As the age progresses, there is an increase in scrotal perimeter, hair darkening, sperm motility and vigor, and reduction of sperm morphological defects of pasture raised Nelore bulls, assessed from 12 to 48 months of age.

Keywords: pelage; semen quality; sexual maturity.

Palavras-chave: pelagem; qualidade seminal; maturidade sexual.

Introdução - A idade à puberdade é uma característica reprodutiva de extrema relevância a ser considerada nos programas de melhoramento das raças zebuínas [1,2,3,4]. Nesta fase, o touro começa a exibir os primeiros sinais de interesse sexual, produção espermática e acentuado crescimento testicular. Sabe-se, portanto, que a idade influencia diretamente os padrões das características andrológicas [5,6]. O perímetro escrotal (PE) é uma das medidas mais práticas

¹ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG.

² Fazenda Vale da Vereda

³ Fazenda Jatobá

⁴ Departamento de Pesquisa, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG.

para aferição de parâmetros biométricos testiculares [2]. Embora estudos em inúmeras espécies tenham demonstrado relação da testosterona e prolactina (um modulador positivo da 5 α -reductase) com o escurecimento da pele/pelagem [7,8], poucos estudos demonstraram que a cor da pelagem pode ter relação com parâmetros seminais. Visto que as raças zebrúinas são a base da pecuária brasileira, que os parâmetros andrológicos têm grande relevância na predição da fertilidade do touro [5,9], e que importância elevada é atribuída para esta predição realizada precocemente [4,6], este estudo teve por objetivo demonstrar o efeito e a associação da idade com características reprodutivas de mensuração prática, desde a puberdade até a maturidade sexual de touros Nelore criados extensivamente no Brasil central.

Material e Métodos - Para o presente estudo, foram utilizados dados de 3039 exames andrológicos de touros da raça Nelore, criados a pasto em trabalho de monta natural. Os animais avaliados apresentavam faixa etária de 12 até 48 meses, oriundos de 21 fazendas de seis estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goias, Bahia).

O exame andrológico consistiu em exame clínico geral e reprodutivo, aferição do PE e avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, de acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [10].

O PE foi aferido por meio de fita métrica graduada (cm), sendo anotado o valor de maior diâmetro dos testículos, enquanto adequadamente pareados.

Para a obtenção do sêmen utilizou-se o método da eletroejaculação (Eletrojet®, Eletrovet, São Paulo, SP, Brasil). Imediatamente após cada coleta, realizou-se a análise microscópica do sêmen. Para tal, aproximadamente 10 μ L de sêmen eram depositados entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C, e avaliado em microscópio óptico com aumento de 100X (modelo ICS standard 25, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Neste momento foram avaliados os parâmetros seminais de motilidade total espermática (Mot; expressa em porcentagem com intervalos de 5%), vigor (V; expressos numa escala de 0 a 5) e turbilhonamento (Tb; expressos numa escala de 0 a 5). As avaliações das características microscópicas imediatas foram feitas visualizando, pelo menos, três campos diferentes e o resultado expresso pela média dos campos avaliados.

Separou-se ainda uma alíquota de sêmen em solução de formol-salina tamponada, para avaliação da morfologia espermática. As análises de morfologia espermática foram realizadas em microscópio de contraste de fase (modelo ICS standard 25, Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Para tal, procedeu-se a preparação de câmara úmida para leitura (alíquota de 10 μ L de sêmen, entre lâmina e lamínula) com aumento de 1000X, contando-se 200 células por amostra, onde foram avaliados os defeitos maiores (DM), defeitos menores (dm) e o total de defeitos espermáticos (TDE). Todas as avaliações de qualidade seminal foram realizadas pelo mesmo técnico.

Adicionalmente, o escore de condição corporal (ECC) e cor do pelame (COR) foram anotados para cada animal avaliado. Para a avaliação do ECC utilizou-se o método de pontuação de 1 a 5, onde 1 = muito magro; 2 = magro; 3 = médio; 4 = gordo e 5 = muito gordo. Para a avaliação da COR, o método utilizado foi o da pontuação de 1 a 4, onde branca = 1; pelagem com pigmentação de cinza a medianamente escura = 2, pelagem escura, principalmente pescoço e membros = 3, muito escura, quase negra no pescoço e membros = 4.

Para análise dos dados os animais foram agrupados por faixas etárias, a saber: de 12 a 18; de 18 a 24; de 24 a 36; de 36 a 48 meses de idade. Para avaliação da associação entre variáveis uma análise de correlação utilizando-se método de Kendall foi utilizada. Para avaliação do efeito da idade sobre as características uma análise multivariada da variância foi realizada. Para comparação pareada utilizou-se método de Bonferroni para construção simultânea de intervalos de confiança para diferença entre idade por variável, utilizando-se teste T a um nível de 0,05 [11]. Todas as análises estatísticas e gráficos foram desenvolvidos em linguagem R.

Resultados e Discussão - Não apenas os parâmetros seminais e PE, mas também a cor do pelame variou conforme a faixa etária dos animais avaliados. Embora a qualidade seminal tenha melhorado com o avanço da idade, os animais apresentaram valores médios satisfatórios de qualidade seminal desde a faixa etária de 12 a 18 meses de idade (tabela 1).

De acordo com a Tabela 1 é possível observar que a evolução da idade ocorre concomitante com a evolução do PE entre as faixas etárias de 12 a 48 meses, conforme relatado em diversos estudos anteriores [1,3,5].

A maturidade sexual nos touros ocorre normalmente 16 a 20 semanas após a puberdade. Nesta ocasião ocorre aumento do comprimento dos túbulos seminíferos e da concentração espermática [12]. Assim, a maturidade sexual é alcançada quando ocorrem estabilização do crescimento gonadal e corporal, juntamente com concentrações de testosterona e desenvolvimento sexual [3]. No presente estudo, foi possível observar aumento do PE, COR, turbilhonamento, motilidade e vigor, bem como redução dos defeitos espermáticos com o avançar da idade, confirmando a ocorrência da maturidade do sexual, o amadurecimento do eixo-hipotálamo-hipófise-gonadal e o aumento da capacidade reprodutiva a medida que a idade evolui, de 12 para 48 meses de idade.

Tabela 1. Parâmetros andrológicos (média \pm erro padrão) oriundos de touros Nelore criados a pasto, em diferentes faixas etárias.

| Idade (meses) | 12 a 18 | 18 a 24 | 24 a 36 | 36 a 48 |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| N | 34 | 928 | 1316 | 761 |
| ECC | 3,89 \pm 0,40 b | 4,00 \pm 0,37 a | 3,88 \pm 0,35 bc | 3,83 \pm 0,35 c |
| COR | 1,45 \pm 0,64 a | 1,50 \pm 0,57 b | 1,51 \pm 0,66 b | 1,60 \pm 0,57 c |
| PE (cm) | 31,63 \pm 3,51 a | 32,00 \pm 3,47 a | 33,56 \pm 3,91 b | 36,66 \pm 3,50 c |
| Mot (%) | 67,73 \pm 17,99 a | 69,60 \pm 29,13 a | 69,46 \pm 15,52 a | 71,04 \pm 16,19 b |
| Vigor | 3,61 \pm 0,69 a | 3,82 \pm 0,69 b | 3,95 \pm 0,77 c | 4,16 \pm 0,81 d |
| Tb | 1,34 \pm 1,36 a | 1,17 \pm 1,46 a | 1,52 \pm 1,65 b | 2,10 \pm 1,85 c |
| DM (%) | 9,19 \pm 13,24 a | 7,88 \pm 12,14 b | 5,81 \pm 9,05 c | 4,48 \pm 8,14 d |
| Dm (%) | 7,16 \pm 10,26 a | 6,90 \pm 11,09 ab | 6,65 \pm 9,15 b | 6,43 \pm 8,68 b |
| TDE (%) | 16,22 \pm 16,95 a | 14,49 \pm 15,00 b | 12,29 \pm 12,92 c | 10,87 \pm 12,97 d |

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$); ECC: escore corporal; COR: cor do pelame; PE: perímetro escrotal; Mot: motilidade espermática; Tb: turbilhonamento; DM: defeitos maiores; dm: defeitos menores; TDE: total de defeitos espermáticos.

Considerações Finais - Concluiu-se que a faixa etária influencia o tamanho testicular, a cor da pelagem e os parâmetros de qualidade seminal. Com o avançar da idade ocorre aumento do perímetro escrotal, escurecimento do pelo, melhora nos índices de turbilhonamento, motilidade e vigor, e redução dos defeitos espermáticos de touros Nelore criados a pasto, avaliados entre 12 a 48 meses de idade. Estas características andrológicas apresentam relação com a maturidade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e correlacionam-se entre si, de modo que esses parâmetros reprodutivos permitem a avaliação de reprodutores para seleção de animais mais precoces.

Referências Bibliográficas

- [1] Brito LFC, Silva AEDF, Unanian MM. et al. Sexual development in early-and late-maturing Bos indicus and Bos indicusxBos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology** 2004;62:1198-217.
- [2] Fonseca VO. Avaliação reprodutiva de touros para monta a campo: análise crítica. **Rev Bras Reprod Anim Supl** 2009; 6:36-41.
- [3] Mello RC. Puberdade e maturidade sexual em touros bovinos. **Rev Agro Cient Semi-Árido** 2013; 10:11-28.
- [4] Costa e Silva EV, Costa Filho LCC, Souza CC. et al. Seleção de touros para reprodução a campo: novas perspectivas. **Rev Bras Reprod Anim** 2015; 39:22-31.
- [5] Fonseca VO, Santos NR, Malinski PR. Classificação andrológica de touros zebus com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. **Rev Bras Reprod Anim** 1997; 21:36-39.
- [6] Oliveira LZ, Oliveira CS, Monteiro FM. et al. Effect of Age on the Andrological Characteristics of Brangus-Ibagé Bulls Extensively Reared in Mato Grosso do Sul. **Acta Sci Vet** 2011;39:946/1-8.
- [7] Gower BA, Nagy TR, Stetson MH. Effect of photoperiod, testosterone, and estradiol on body mass, bifid claw size, and pelage color in collared lemmings (*Dicrostonyx groenlandicus*). **Gen Comp Endocrinol** 1994; 93:459-70.
- [8] Foitzik K, Krause K, Nixon AJ. et al. Prolactin and its receptor are expressed in murine hair follicle epithelium, show hair cycle-dependent expression, and induce catagen. **Am J Pathol** 2003; 162:1611-21.
- [9] Chenoweth PJ. Examination of bulls for libido and breeding ability. **Vet Clin N Am Large Anim Pract** 1984; 5:59-74.
- [10] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3th ed. Belo Horizonte; 2013.
- [11] Johnson RA, Wichern DW. **Applied multivariate statistical analysis**, 6 ed., Pearson., 2007.
- [12] Lunstra DD, Echternkamp SA. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. **J Animal Sci** 1982; 55:638-648.

Leiomioma prostático em cão: relato de caso

Kárita da Mata Fuchs¹
karitafuchs@hotmail.com

Rodrigo Freitas Bittencourt¹

Eduardo Luiz Trindade Moreira²

Carmo Emanuel Almeida Biscarde¹

Morgana Duarte Felix¹

Elton Amorim Romão¹

Gleice Mendes Xavier¹

Felipe da Silva Neri¹

Abstract: A Poodle dog, 15 years old, unilateral cryptorchid, weighing 7.2 kg, was attended by the veterinary hospital of the Federal University of Bahia. During anamnesis, an increase in volume was observed in the perineal region and presence of mass and pain on abdominal palpation. In the ultrasonographic use, neoformation was observed near the bladder and the animal was submitted to exploratory laparotomy. A total prostatectomy was performed and the material was submitted to the pathology sector, where it was verified the presence of a prostatic leiomyoma. The animal was followed up for one year after the surgical procedure and it was verified complete cure of the neoplastic process, presenting only urinary incontinence as a consequence of the surgery.

Keywords: Prostate neoplasms; canine; histopathology.

Palavras-chave: Neoplasias prostáticas; canino; histopatologia.

Introdução - As afecções prostáticas são frequentes em machos inteiros e com mais de seis anos de idade, entre as mais comuns estão a hiperplasia prostática benigna, as prostatites, os cistos prostáticos e as neoplasias prostática [1,2]. Os cães desenvolvem tumor prostático espontaneamente com origem desconhecida, não responsiva à terapia de privação de andrógenos e, geralmente, são diagnosticados no estágio avançado da doença [3].

Os sinais clínicos esperados são a perda de peso, claudicação e fraqueza dos membros pélvicos, tenesmo, disquezia, estrangúria, disúria, poliúria, hematúria e dores abdominais ou lombares [3].

A origem dos tumores prostáticos está ligada a tipos de tecidos que se diferenciam em: carcinomas, de tecido epitelial; leiomiossarcomas, de tecido muscular liso, e hemangiossarcomas, de tecido vascular [4].

¹ Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

² Setor de Patologia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

Leiomiomas são tumores de característica benigna, que podem resultar em obstrução intestinal e urinária. O único tratamento eficaz para promover a cura é a ressecção cirúrgica completa [5]. Seu desenvolvimento é mais comum no trato gastrointestinal, genital feminino e em órgãos com musculatura lisa. Quando ocorre na próstata, os sinais clínicos esperados são os mesmo dos s observados em outros tipos de tumores [6]

O diagnóstico baseia-se nos sinais clínicos, no exame de inspeção digital via retal, nos exames radiográfico e ultrassonográfico, exames citológico e histopatológico, onde são observados feixes de células do fuso entrelaçados com núcleos alongados, uniformes, esporadicamente vacuolizados[7,8]. Trata-se de um quadro com bom prognóstico quando realizada ressecção total da glândula, sem recidivas [6].

Desta forma, objetivou-se com este trabalho relatar o caso de um canino acometido por um leiomioma prostático atendido pelo setor de Reprodução Animal e Obstetrício Veterinária do Hospital de Medicina Veterinária prof. Renato Rodenburg de Medeiros Neto (HOSPMEV/UFBA) pertencente à Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Material e Métodos - Foi atendido pelo setor de Reprodução Animal e Obstetrício Veterinária do Hospital de Medicina Veterinária prof. Renato Rodenburg de Medeiros Neto (HOSPMEV/UFBA) da Universidade Federal da Bahia um caso de leiomioma prostático em um cão da raça Poodle, 15 anos, criptorquida unilateral, pesando 7,2 kg. Durante a anamnese, o tutor relatou que o paciente apresentava um nódulo em região próximo ao ânus, disúria, disquezia e hematoquezia há oito dias, além de um importante aumento do testículo que se apresentava no escroto.

Ao exame físico, o animal apresentava apatia, caquexia, normohidratado, temperatura retal de 38°C, frequência cardíaca de 216 batimentos por minuto, ofegante, dor intensa e aumento de volume em região perineal e massa firme à palpação abdominal. No exame específico do sistema genital, foi observado pênis edemaciado e apenas um testículo em região anatômica correta.

Na ultrassonografia de abdome foi visibilizada bexiga repleta com conteúdo de alta celularidade e com deslocamento, próxima a ela, observou-se neoformação em região proximal, com textura heterogênea, áreas anecogênicas e ecogenicidade mista. Seguiu-se, então, como suspeita de processo neoplásico medindo 8,14 x 4,04 cm, a ser confirmada através de laparotomia exploratória. O testículo em bolsa mediu 1,73 x 1,11 cm com presença de hidrocele.

Foi recomendado laparotomia exploratória de emergência e realizado exames pré-cirúrgicos, como hemograma, bioquímico, radiografia de tórax, eletrocardiograma e urinálise. O hemograma e bioquímicos iniciais apresentaram valores aceitáveis para a espécie e para teto cirúrgico. O exame radiográfico revelou campos pulmonares e silhueta cardíaca sem alterações radiográficas dignas de nota; o eletrocardiograma demonstrou taquicardia sinusal, considerada normal para a idade do paciente.

Para a cirurgia utilizou-se anestesia geral inalatória, medicação pré-anestésica clorpromazina (0,2 mg/kg IV) e tramadol (3 mg/kg IV), indução com midazolam (0,2 mg/kg IV) e

manutenção com sevoflurano 2%. No transcirúrgico foi utilizado meloxicam (0,4mg/kg IV) e cefalotina (30 mg/kg IV).

Previamente ao procedimento cirúrgico, o animal foi submetido à sondagem uretral (nº 6) quando então, realizou-se celiotomia na região direita lateral ao pênis. Ao acessar a cavidade, a próstata foi visualizada com aumento de volume, encapsulada e formato irregular. Assim, optou-se pela prostatectomia total. Foi realizada secção da uretra com posterior anastomose vesicouretral ao colo da vesícula urinaria. O animal ainda foi submetido à orquiectomia do testículo abdominal pelo mesmo acesso cirúrgico orquiectomia do testículo em topografia correta.

Para o pós-operatório foi prescrito amoxicilina com clavulanato (20mg/kg BID/ 10dias VO), cloridrato de tramadol (1mg/kg TID/ 3 dias VO) e meloxicam (0,2 mg/kg CID/ 4 dias VO).

A próstata, removida inteira, e os testículos foram acondicionados separadamente em solução de formol a 10%. As amostras foram enviadas ao laboratório de patologia do próprio hospital, para realização do histopatológico. O paciente foi encaminhado ao internamento onde foi realizado acompanhamento clínico e laboratorial.

Resultados e Discussão - O animal apresentou alterações em trato urogenital semelhante às encontradas por [3], onde foi observado na urinálise pH de 6,5; presença de leucócitos, hemácias e bactérias, além dos sinais clínicos de disúria e hematúria.

O testículo em cavidade abdominal em sua descrição macroscópica mediu 1,9 x 4,5 x 2,0 cm, de superfície irregular, brancacento e firme. Ao corte, compacto acinzentado com área brancacenta. Microscopicamente as secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina não revelaram alterações dignas de nota.

O testículo em escroto mediu 4,0 x 3,2 x 0,6 cm, levemente irregular, firme elástico. Ao corte, observou-se nódulo medindo 2,0 x 2,0, bem delimitado com áreas extensas gelatinosas e áreas compacta de coloração pardacenta. À microscopia as secções histológicas coradas em hematoxilina e eosina revelaram proliferação de células intersticiais expansiva e compressiva, discretamente pleomórficas. Associado à proliferação, verificou-se, áreas hemorrágicas focalmente extensas e discreta quantidade de vacúolos delimitados. O citoplasma é moderado, com bordos distintos e eosinofílico, com presença de moderada quantidade de grânulos. O núcleo é oval a redondo com cromatina moderadamente cromática e núcleos são inconspícuos. Não foi possível observar mitose. Com estes achados conclui-se a ocorrência de Leydigocitoma cisto-vascular no testículo criptorquida.

A próstata macroscopicamente mediu 8,0 x 8,5 x 8,0 cm, de superfície irregular enegrecida com áreas pardacentas, firmes a firme-elásticas. Ao corte, superfície multinucleada, brancacenta com áreas enegrecidas e pardacentas e feixes multidirecionais. As secções histológicas coradas com hematoxilina e eosina, demonstraram, proliferação de células mesenquimais densamente celular, bem diferenciadas, discretamente pleomórficas e distribuídas em feixes multidirecionais. O citoplasma escasso com bordos indistintos e eosinofílico. O

núcleo fusiforme moderadamente cromático e nucléolos inconspícuos. Sob coloração especial de tricrômio de Masson observou-se forte reação para fibras musculares, revelando um leiomioma prostático. Tal perfil histopatológico se assemelha ao encontrado por Holdsworth e colaboradores (2015).

O caso relatado neste trabalho, envolve um paciente senil não castrado e corrobora com as discussões de [2], onde cães nesse perfil tem mais chances de desenvolver afecções prostáticas.

O animal foi acompanhado durante um ano após o procedimento cirúrgico e foi constatado apenas incontinência urinária adquirida com cura total do quadro neoplásico, assim como relatado por [6].

Considerações Finais - A incidência de neoplasias prostáticas é baixa e neste relato diagnosticou-se um caso raro de leiomioma prostático. A prostatectomia total confirmou sua eficácia no tratamento da neoplasia. O animal foi acompanhado durante um ano após o procedimento cirúrgico e não foi observado recidiva.

Referências Bibliográficas

- [1] JOHNSTON, S.D.; KAMOLPATANA, K.; ROOT-KUSTRITZ, M.V.; JOHNSTON, G.R. Prostatic disorders in the dog. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61 p. 405–415, 2000.
- [2] SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, p. 375–383, 2008.
- [3] LEROY, B.E.; NORTHRUP, N. Prostate cancer in dogs: Comparative and clinical aspects. **The Veterinary Journal** 180 p. 149–162, 2009.
- [4] FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**, editor Roca 2ª Ed, SÃO PAULO - SP 2005.
- [5] ALVES, A. P. et al. Leiomioma obstrutivo em cólon descendente de cão-relato de caso. **38º Congresso Brasileiro da Anclivepa**, Recife-PE, 2017
- [6] RUBIO MUNOZ, A.; BERNÉ MANERO, J.M.; BONO ARINO, A.; SANZ VELEZ, J.I.; ESCLARÍN DUNY, M.; MARIGIL GÓMEZ, M.A. Pure prostatic leiomyoma. **ActasUrolEsp** 2000; 24: 40–2. In Spanish, 2000.
- [7] GALVÃO, A. L. B.; FERREIRA, G. S.; LÉGEA, E.; COSTA, P. F.; ONDANI, A. C.; DENICOL, A. Principais afecções da glândula prostática em cães. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.456-466, 2011.
- [8] HOLDSWORTH, A., BLÉHAUT, T., REEVE, L., DAY, M.J., WARREN-SMITH, C. An incidental prostatic leiomyoma in a dog. **Vet Rec Case Rep**, 2015.

Proporção de espermatozoides hiperativados em doses de sêmen descongeladas de bovino

Ana Beatriz Marques de Almeida¹
biamarquesvet30@gmail.com

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹

Anne Kemmer Souza¹

Carlos Augusto Melanda¹

Luiz Guilherme Corsi Trautwein¹

Maria Isabel Mello Martins¹
imartins@uel.br

Abstract: Hyperactivated spermatozoa present higher values of lateral head movement (ALH) and curvilinear velocity (VCL), simultaneously to lower linear motion (LIN) values, when analyzed by the computerized system CASA. This study aimed to evaluate the hyperactivated spermatozoa proportion after thawing and analysis by the CASA system. Computerized analysis results of 127 semen doses from 74 bulls were collected. Results were tabulated and classified as hyperactivated and non-hyperactivated, according to Marquez and Suarez (2007) sperm hyperactivation parameters. Proportion results were submitted to a difference test between two proportions on RStudio software. It was observed that most doses of frozen semen (56%) presented hyperactivated behavior. Also, there was a statistically significant difference between the non-hyperactivated and hyperactivated semen doses proportions ($p = 0.03$). It was concluded that most of semen doses (56%) have hyperactivated behavior post-thawing. For being a highly energetic state of the spermatozoa, hyperactivity may decrease spermatozoa half-life.

Keywords: ALH; CASA system; sperm hiperactivation.

Palavras-chave: ALH; hiperativação espermática; sistema CASA.

Introdução - A hiperativação espermática é um evento fisiológico, considerado uma etapa da capacitação espermática, sendo essencial para a fecundação do oócito [1]. O espermatozoide inicia sua capacitação quando alcança as tubas uterinas, em decorrência do pH local e da viscosidade das secreções tubáricas [2]. Acredita-se que para que os espermatozoides possam se desprender do epitélio do ístimo das tubas, devem ser hiperativados, ou seja, aumentam o batimento de caudas, para que possam ir em direção ao oócito [3,4].

A hiperativação é um processo que deve ocorrer poucos instantes antes do encontro entre espermatozoide e oócito; por se tratar de um evento que exige grande gasto de energia por parte do espermatozoide, caso aconteça prematuramente, o espermatozoide terá menores

¹ UEL - Universidade Estadual de Londrina

chances de realizar a fecundação [5]. Na avaliação da cinética espermática, aqueles hiperativados apresentam alta amplitude e batimento flagelar assimétrico [6,1].

Ejaculados colhidos de touros de excelência fenotípica e genotípica, necessitam passar por uma série de análises, para prever a capacidade fertilizante dos espermatozoides. A análise de sêmen computadorizada (sistema CASA) tem função de aferir características cinéticas individuais dos espermatozoides avaliados. A hiperatividade espermática promove alterações no batimento flagelar como característica mais fidedigna, no entanto como o sistema CASA realiza a leitura da cabeça dos espermatozoides, é possível avaliar células espermáticas em situação hiperativada de uma maneira indireta, ao analisar a amplitude do movimento lateral de cabeça (ALH), velocidade curvilínea (VCL) e linearidade (LIN) [3]. Estudos de Marquez e Suarez [7] indicam hiperatividade espermática quando os resultados apresentam, simultaneamente: $ALH > 7\mu\text{m}$, $VCL > 80\mu\text{m/s}$ e $LIN \leq 65\%$.

O objetivo deste estudo foi avaliar a proporção de hiperativação espermática em doses de sêmen bovino pós descongelação.

Material e Métodos - Foram compiladas análises de 127 doses de sêmen descongelado de bovino (PAS. BIOT.REP.ANIM), proveniente de 74 touros de raça taurinas e zebuínas, as quais possuíam motilidade total acima de 30%, como o exigido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [8], como aptas para o uso em biotécnicas reprodutivas. Todas as avaliações foram feitas no mesmo sistema CASA, no período de quatro anos (2014 a 2018). As doses foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Uma amostra de 3 μL de sêmen foi colocada em câmara Cell-Vu® pré-aquecida e coberta por uma lamínula para a leitura pelo sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne IVOS II, Beverly, MA, USA, setup para espécie bovina). Foram consideradas células espermáticas hiperativadas, aquelas que apresentaram $ALH > 7,0\mu\text{m}$, $VCL > 80\mu\text{m/s}$, $LIN \leq 65\%$, conforme proposto por Marquez e Suarez [7].

Os dados obtidos foram tabulados, contabilizados e categorizados como hiperativados ou não, com os resultados expressos em porcentagem. Após, foi realizado um teste de diferença entre duas proporções, no *software* RStudio®, para comparar as proporções de doses hiperativadas e não hiperativadas, avaliando a diferença estatística entre elas. Considerado significativo quando valor de $p < 5\%$.

Resultados e Discussão - Das 127 doses de sêmen avaliadas com mínimo de 30% de motilidade, observou-se 56% de média de motilidade total e 32% de média de motilidade progressiva. Os parâmetros avaliados indicativos de hiperativação apresentaram as seguintes médias: ALH- 7,06 μm , VCL- 150 $\mu\text{m/s}$ e LIN- 47,5%, sendo todos os valores médios condizentes com as características de hiperatividade. Das doses de sêmen bovino descongeladas analisadas no sistema CASA, 56% demonstraram comportamento hiperativado, enquanto 44% das doses não se apresentaram hiperativadas, como exposto na Tabela 1. Houve diferença estatística entre as proporções de doses hiperativadas e não hiperativadas ($p=0,0328$).

Tabela 1- Resultados obtidos de parâmetros que indicam hiperatividade espermática em 127 doses de sêmen bovino descongeladas.

| Parâmetros avaliados | Nº DE DOSES | % DE DOSES |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|
| ALH > 7,0µm | 73 | 57,5% |
| VCL > 80µm/s | 125 | 98,4% |
| LIN ≤ 65% | 125 | 98,4% |
| Hiperativadas | 71 | 56% |
| Não hiperativadas | 54 | 44% |

O presente estudo demonstrou haver uma maior proporção de doses hiperativadas após a descongelação. A hiperativação em doses pós- descongelação pode ser explicada pelo fato do processo de congelação de espermatozoides induzir a produção de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio. Sendo que, espécies reativas ao oxigênio em quantidades controladas participam da hiperativação e capacitação espermática [9,10].

Este estudo corrobora com os resultados de Shojaei et al. [11], que ao analisarem a motilidade em doses de sêmen pós-descongelação de touros de alta e baixa fertilidade, notaram que o sêmen de touros de alta fertilidade apresenta maior proporção de hiperativação, sendo 9,6% em doses de animais com alta fertilidade e 3,2% em animais de baixa fertilidade. Além disso, observaram haver uma correlação ($r=0,83$) entre hiperativação espermática e fertilidade dos touros Holandeses. No entanto, resultados contrários foram identificados por Ledesma et al. [12] ao avaliarem sêmen criopreservado de carneiros, identificando maior porcentagem de espermatozoides hiperativados em machos menos férteis,

Foram identificadas neste estudo 56% de doses hiperativadas utilizando a metodologia de identificação de hiperativados segundo Marquez e Suarez [7], resultados diferentes do de Gillan e colaboradores [13], que obtiveram 10,8% de doses hiperativadas em sêmen pós-descongelação; tal discrepância pode ser explicada pelo fato de que o referido grupo utilizou um número menor de animais e parâmetros de hiperatividade utilizados para humanos ($VCL \geq 155$, $VSL \leq 100$, $LIN \leq 65$ e $ALH \geq 5,5$)

Estudos de Suarez [5] apontam que a hiperativação ocorre com o intuito dos espermatozoides se desprenderem de substancias viscosas presentes na tuba uterina e penetrar a zona pelúcida do oócito. Sendo um comportamento útil para a transposição das barreiras físicas do trato genital feminino [11]. Porém, em doses congeladas, a hiperatividade espermática se dá por efeitos da criocapacitação, e pode induzir diminuição na meia vida dos espermatozoides [12].

Conforme o exposto, a hiperativação espermática em sêmen congelado pode ser um fator interessante para a inseminação de vacas que apresentam ovulação precoce, no entanto, estudos correlacionando comportamento hiperativado e taxa de prenhez em vacas de ovulação precoce devem ser realizados.

Considerações Finais - Baseados nos resultados obtidos é possível concluir que a maior parte das doses de sêmen descongeladas (56%) possui comportamento hiperativado, e por ser

um estado altamente energético dos espermatozoides, a hiperatividade pode diminuir a meia vida dos espermatozoides.

Referências Bibliográficas

- [1] Talukdar, D. J.; Ahmed, K.; Talukdar, P. Cryocapacitation and fertility of cryopreserved semen. **International Journal of Livestock Research**, v. 5, n. 6, p. 11-18, 2015.
- [2] Mortimer, S. T.; Van Der Horst, G.; Mortimer, D. The future of computer-aided sperm analysis. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 4, p. 545, 2015.
- [3] Suarez, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human reproduction update**, v. 14, n. 6, p. 647-657, 2008.
- [4] Simonik, O.; Sichtar, J.; Krejčarkova, A.; Rajmon, R.; Stadnik, L.; Beran, J.; Biniova, Z. Computer assisted sperm analysis—the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: a review. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 85, n. 1, p. 3-11, 2015.
- [5] Suarez, S. S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 1, p. 185-194, 2016.
- [6] Marquez, B.; Suarez, S. S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1626-1633, 2004.
- [7] Marquez, B.; Suarez, S. S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. **Biology of reproduction**, v. 76, n. 4, p. 660-665, 2007.
- [8] Animal, Colégio Brasileiro de Reprodução. **Manual Para Exame Andrológico de Sêmen Animal**. 2013.
- [9] Sariözkan, S.; Bucak, M. N.; Tuncer, P. B.; Büyükleblebici, S.; Eken, A.; Akay, C. Influence of fetuin and hyaluronan on the post-thaw quality and fertilizing ability of Holstein bull semen. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 119-124, 2015.
- [10] Almeida, F. C.; Silva, S. V.; Souza, H. M.; Gomes, W. A.; Lima Filho, J. A. C.; Wicke, A. A.; Guerra, M. M. P. Effects of glycerol, equilibration time and antioxidants on post-thaw functional integrity of bovine spermatozoa directly obtained from epididymis. **Andrologia**, v. 49, n. 3, 2017.
- [11] Shojaei, H.; Kroetsch, T.; Wilde, R.; Blondin, P.; Kastelic, J. P.; Thundathil, J. C. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p. 940-951, 2012.
- [12] Ledesma, A.; Zalazar, L.; Fernández-Alegre E.; Hozbor, F.; Cesari, A.; Martínez-Pastor, F. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved semen of rams with lesser fertility. **Animal reproduction science**, v. 184, p. 44-50, 2017.
- [13] Gillan, L.; Kroetsch, T.; Maxwell, W. C.; Evans, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal reproduction science**, v. 103, n. 3-4, p. 201-214, 2008.

Há influência das células rápidas identificadas pelo sistema CASA sobre a qualidade do sêmen descongelado de bovinos?

Myrian Megumy Tsunokawa Hidalgo¹
myrian.hid@gmail.com

Ana Beatriz Marques de Almeida¹

Anne Kemmer Souza¹

Luiz Guilherme Corsi Trautwein¹

Carlos Augusto Melanda¹

Maria Isabel Mello Martins¹
imartins@uel.br

Abstract: Computer semen analysis (CASA) has become the most widely used method for evaluating spermatic kinetics, providing reliability and speed on data collection. The aim of this study was to correlate the proportion of fast cells within progressive motility of post thaw bull semen, considering as a parameter that contributes to predict ejaculate's quality. CASA analysis of 138 bull semen doses was carried out. The statistic was performed by correlation between fast cells, motilities and spermatic velocity, by the Pearson method. The percentage of fast cells had high and significant correlation ($p < 0.05$) when compared to total and progressive motility, medium correlation when compared to velocity parameters, but with ALH the correlation was low, suggesting that fast sperm cells contributes to predict the quality of the ejaculate.

Keywords: bovine; criopreservation; espermatozoa.

Palavras-chave: bovino; criopreservação; espermatozoide.

Introdução - A motilidade espermática tem sido considerada como uma das características mais importantes em relação à capacidade de fecundação do oócito [1,2].

Devido ao fato de que o sêmen criopreservado é usado inteiramente nas biotécnicas de reprodução bovina, sendo assim, a estimativa da motilidade antes da criopreservação está intimamente relacionada à qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento [3].

A avaliação pelo sistema CASA, além de minimizar erros que são influenciados pela análise subjetiva de cada técnico, permite o exame com uma maior acurácia, identificando um número maior de espermatozoides [4, 5, 6]. O sistema de análise computadorizada do sêmen pode ser considerado como uma ferramenta mais eficaz, precisa e confiável para a avaliação da qualidade espermática do que a avaliação subjetiva de machos reprodutores. Além dos resultados obtidos serem objetivos, repetíveis com maior capacidade preditiva e serem padronizados [6].

¹ UEL- Universidade Estadual de Londrina

Dentro das análises é possível calcular valores individuais e médios da motilidade total (MOT T %) da amostra, motilidade progressiva (MOT P %), velocidade espermática ao longo de uma trajetória curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP - $\mu\text{m/s}$), velocidade espermática linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH - μm) e concentração espermática ($\times 10^6/\text{mL}$), obtida pelo número de espermatozoides por centímetro cúbico [5]. Além dos parâmetros citados acima, o sistema CASA permite a contagem de células, a qual fornece a proporção de células rápidas (CEL RAP), médias, lentas e estáticas dentro da amostra. Estes indicadores possuem um alto valor informativo, caracterizando o estado fisiológico do espermatozoide e sua possível capacidade de fecundação; assim, eles fornecem informações mais precisas com relação à estimativa da qualidade do sêmen. Como não há uma padronização para o sistema CASA quanto a interpretação da porcentagem de células rápidas na amostra e sua correlação com outros parâmetros [7], uma categorização elaborada para humanos é citada, demonstrando que dependendo dos valores baixo e médio de VAP (LVV e MVV) e do valor mínimo de STR, espermatozoides rápidos são considerados espermatozoides com $VAP > MVV$, médios $LVV < VAP < MVV$, lentos $VAP < LVV$ e estáticos sem qualquer movimento durante a análise. A porcentagem de espermatozoides com MOT P consequentemente estabelecida pela VAP que excede o MVV e o valor mínimo de STR [8] Em sêmen de bovinos, os valores precisos para categorização ainda não foram estabelecidos. Assim, o objetivo desse trabalho foi correlacionar a porcentagem de células espermáticas rápidas com os resultados de motilidade total e progressiva, e cinética espermática de sêmen descongelado de bovino aprovados segundo critérios do CBRA, como uma possível ferramenta para prever a qualidade do sêmen.

Material e Métodos - Foram avaliados os resultados das análises de 138 doses de sêmen descongelado de bovino (PAS.BIOT.REP.ANIM), oriundos de 70 touros mestiços das subespécies *taurus* e *indicus*. As doses foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e a análise realizada pelo sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne IVOS II, Beverly, MA, USA). Uma alíquota de sêmen de 3 μL foi depositada diretamente sobre a câmara CELL-VU® coberta por uma lamínula de vidro, pré-aquecidas a 37°C. Foram selecionados cinco campos aleatórios e a contagem das células ocorreu por meio da captura de 30 imagens por segundo utilizando o *setup* para a espécie bovina (VAP *cut-off* 30 $\mu\text{m/s}$; progressive minimum VAP 50 $\mu\text{m/s}$; VSL *cut-off* 15 $\mu\text{m/s}$; cell intensity 80; magnification 1.89 e frequência de 60Hz). A concentração média das amostras foi de 30×10^6 sptz/mL em palheta de 0,5mL.

A análise estatística foi realizada por meio da correlação entre as células rápidas e os parâmetros de motilidade e velocidade, sendo estabelecido com o coeficiente de correlação (r) de acordo com o método de Pearson. Considerando que valores de $r = 0-0,3$ apresentam correlação baixa, valores de $r = 0,3-0,6$ são considerados com média correlação e valores de $r = >0,6$ apresentam correlação alta. Foi considerado o nível de significância $p < 0,05$. A análise foi realizada utilizando o programa Sigma Plot 11.0.

Resultados e Discussão - Os resultados da correlação entre a porcentagem de células rápidas e os parâmetros de velocidade e motilidade espermática, estão apresentados na Tabela 1. A porcentagem de células rápidas teve correlação alta e significativa ($p < 0,05$) quando comparadas a motilidade total e progressiva, correlação média quando comparadas aos parâmetros de velocidade, porém, com o ALH a correlação foi baixa.

Tabela 1- Correlação entre os parâmetros de células rápidas, motilidade e velocidade espermática de 138 doses de sêmen de bovino descongeladas.

| | CÉL RAP | MOT T | MOT P | VAP | VSL | VCL | ALH |
|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CÉL RAP | 1,000 | 0,871* | 0,890* | 0,593* | 0,536* | 0,529* | 0,282* |
| MOT TOTAL | | 1,000 | 0,840* | 0,228* | 0,219* | 0,187* | 0,004 |
| MOT PROG | | | 1,000 | 0,337* | 0,480* | 0,214* | -0,046 |
| VAP | | | | 1,000 | 0,795* | 0,941* | 0,776* |
| VSL | | | | | 1,000 | 0,588* | 0,438* |
| VCL | | | | | | 1,000 | 0,876* |
| ALH | | | | | | | 1,000 |

* $p < 0,05$

A motilidade progressiva dos espermatozoides, juntamente com os parâmetros de cinética são essenciais para que os espermatozoides alcancem o local da fertilização. As variáveis cinéticas dos espermatozoides, como motilidade progressiva, VSL, VCL, e ALH, foram correlacionadas com a fertilidade de touros [9]. Embora não encontram-se estudos correlacionando a porcentagem de células rápidas, foi evidenciado uma correlação alta com a motilidade total e progressiva, e correlação média com o VAP, VSL e VCL sugerindo que os espermatozoides rápidos contribuem para prever a qualidade do ejaculado.

Apesar de ter sido identificada correlação média ($p < 0,05$) entre as células rápidas e o VCL ($r = 0,529$) e baixa com ALH ($R = 0,282$), a alta correlação da VCL e ALH dos espermatozoides ($r = 0,876$) representa que quando é identificada velocidade curvilínea alta e larga amplitude de deslocamento lateral da cabeça, pode ter ocorrido a hiperativação dos espermatozoides [10]. Tem sido relatado que em bovinos os parâmetros específicos de movimento estão relacionados à fertilidade [9], mas o limite para essas características de movimento ainda não foram estabelecidos em um consenso geral.

No sistema CASA, quando as variáveis de linearidade ou motilidade linear são maiores, sugere-se que os espermatozoides têm maior taxa de fertilização comparado à porcentagem de motilidade total [11] e amostras de sêmen contendo tais espermatozoides apresentam maiores taxas de fertilidade e prenhez após inseminação artificial [12].

Considerações Finais - A identificação da porcentagem de células rápidas dentro da amostra de sêmen congelado de bovino pode ser uma contribuição na avaliação computadorizada da qualidade do ejaculado, estimando melhor fertilidade.

Referências Bibliográficas

- [1]Rodríguez – Martínez H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, vol 41, p.2-10, 2006.
- [2]Awad M M. 2011. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science** 123: 157–62
- [3]Fitzpatrick L A.; Fordyce G, McGowan M R, Bertram J D, Doogan V J, De Faveri J, Miller R G and Holroyd R G. 2002. Bull selection and use in northern Australia. Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science** 71 (1-2): 39–49.
- [4]Amann R P; Waberski D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, vol 81, p 5–17.e1–e3, 2014.
- [5]Verstegen J.; Iguer-ouada M.; Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- [6]Kathiravan P.; Kalatharan J.; Karthikeya G.; Rengarajan K AND Kadirvel G. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System - A Review. **Reproduction in Domestic Animals**, v 46 (1): 165-72, 2011.
- [7]Feitsma H.; Broekhuijse M L W J.; Gadella B M. 2011. Do CASA Systems Satisfy Consumers Demands? A Critical Analysis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 49–51.
- [8]World Health Organization. 2010. **WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of human semen**. 5th edition, p 138. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- [9]Perumal P.; Selvaraju S.; Selvakumar S.; et al. “Effect of preefreeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred jersey bulls on sperm parameters and conception rates.” **Reproduction in Domestic Animals**, vol. 46, no.4, pp.636–641, 2011.
- [10]Aitken R. J. ; Sutton M.; Warner P.; Richardson D. W. “Relation ship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes,” **Journal of Reproduction and Fertility**, vol.73, no.2, pp.441–449, 1985.
- [11]Cremades T.; Roca J.; Rodríguez-Martínez H.; Abaigar T.; Vázquez J.M.; Martínez E. A. “Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa,” **Journal of Andrology**, vol.26 ,no.5, pp.610–618, 2005.
- [12]Farrel P. B.; Presicce G. A.; Brockett C. C.; Foote R. H. “Quantification of bull sperm characteristics measured by computer–assisted sperm analysis (CASA) and their relationship to fertility,” **Theriogenology**, vol.49, pp.871–879, 1998.

Agradecimentos: A bolsa de mestrado CAPES.

Neoplasia testicular mista em cão: relato de caso

Gleice Mendes Xavier¹
gleicemxavier@hotmail.com

Rodrigo Freitas Bittencourt¹
Carmo Emanuel Almeida Biscarde¹
Catharina Albuquerque Vieira¹
Larissa Rodrigues Santana¹
Alessandro Bitencourt Nascimento¹
Morgana Duarte Félix¹
Adrielle da Silva Lima¹
Kárita da Mata Fuchs¹
Felipe da Silva Neri¹

Abstract: Testicular neoplasms are prevalent in dogs. The most common are seminoma, leydig cells and sertoli cells. The diagnosis of these tumors is confirmed with histopathology of the testicle collected during surgery for tumor removal. We report the occurrence in a dog crossbred, 12 years and 9 months old, with an increased testicular volume, histopathologic diagnosis confirmed the presence of presence of two nodules being a leydigocitoma in telangiectasic pattern and the other a seminoma with testicular degeneration.

Keywords: testicular tumor; leydigocitoma; seminoma.

Palavras-chave: tumores testiculares; leydigocitoma; seminoma.

Introdução - As neoplasias testiculares vêm sendo diagnosticadas com mais frequência em cães, elas são responsáveis por causar desordens na fertilidade e sobre o comportamento sexual dos animais acometidos. A sociedade moderna apresenta o novo estilo de vida, assim como a interferência do homem nos hábitos alimentares e no ambiente dos animais contribui para aumentar a exposição a diversos fatores potencialmente carcinogênicos. Provavelmente essa mudança seja uma das justificativas da frequência de algumas neoplasias no homem e nos animais equiparam- se [1].

Os tumores testiculares acometem cães idosos. Esses podem ser classificados em: tumores de células germinativas, abrangendo o seminoma, carcinoma embrionário e teratoma; tumores de células intersticiais: que incluem o tumor das células de Leydig; tumor de células de Sertoli, sendo esses os mais comuns em cães. Ainda ocorrem os tumores primários múltiplos; mesotelioma e tumores estromais e vasculares [2, 3].

Os seminomas tem maior ocorrência em animais criptorquidas e apresentam origem multicêntrica no interior do testículo, raramente produzem metástases e desencadeiam

¹ Setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária, Departamento de Anatomia, Patologias e Clínicas Veterinária, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

sinais clínicos inespecíficos como aumento de volume, dor a palpação e outros mais [3, 4]. Os tumores de células intersticiais ocorrem em testículos localizados no escroto, na forma de nódulos pequenos e múltiplos podendo levar à uma sutil alteração do testículo afetado [5].

O diagnóstico definitivo para essas afecções ocorrem somente através do exame histopatológico. Recomenda-se como tratamento de eleição a orquiectomia bilateral dos testículos. Sendo assim, este estudo objetivou relatar o caso de um canino acometido por leydigocitoma de padrão telangiectásico e seminoma intratubular, associada a presença de uma atrofia testicular contralateral.

Relato de Caso - Foi atendido no setor de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária do Hospital de Medicina Veterinária Professor Renato Rodenburg de Medeiros Neto, da Universidade Federal da Bahia, um cão sem raça definida com 12 anos e 9 meses de idade, pesando 26,1 kg. O proprietário relatou que o animal apresentava aumento de volume escrotal, iniciado há alguns meses atrás. Após a anamnese, procedeu-se o exame físico geral, quando verificou-se que os parâmetros fisiológicos estavam dentro da normalidade. No exame específico, foi realizada a palpação testicular, sendo observado testículo com aumento do volume e da consistência, com perda da arquitetura normal. Externamente a estrutura examinada, era perceptível a presença de coleção de líquido. Na inspeção não foi possível identificar o testículo contralateral, foi realizado exame ultrassonográfico do testículo. Foi indicado ao tutor a realização de uma orquiectomia terapêutica com ablação total de bolsa escrotal. Logo, foram solicitados exames complementares e pré-operatórios.

Previamente à orquiectomia terapêutica, o animal foi submetido a medicação pré-anestésica com clopromazina (0.2 mg/kg/IV) e cloridrato de tramadol (3 mg/kg/IV). A indução anestésica foi realizada com propofol (4mg/kg/IV) e o isoflurano a 2% foi empregado para a manutenção anestésica. Na anestesia local foi utilizado 5mL de lidocaína sem vasoconstritor e no trans-cirúrgico foi utilizado meloxicam (0,1 mg/kg/IV) como antiinflamatório e cefalotina (30mg/kg/IV) como antibiótico. Foi realizada a ablação total da bolsa escrotal com a musculatura fechada com fio catgut cromado 2.0 e padrão de sutura em x separado. No subcutâneo foi utilizado o catgut 2.0 e o padrão de sutura utilizado foi a intradérmica. A pele foi suturada com nylon 2.0 em sutura de Wolf. Para o pós-cirúrgico foi prescrito amoxicilina com clavulanato (20mg/kg BID V.O durante 10 dias); carprofeno (4,4 mg/kg SID V.O durante 3 dias); dipirona (20mg/kg TID V.O durante 4 dias) e cloridrato de tramadol (2 mg/kg TID V.O durante 4 dias).

O testículo acometido foi retirado da bolsa escrotal, fixado em formol a 10% e encaminhado ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFBA para análise histopatológica, no qual os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE).

Resultados e Discussão - Os exames hematológicos e bioquímicos apresentaram-se com parâmetros normais. No exame ultrassonográfico de abdômen total os órgãos abdominais não apresentaram alterações. Na ultrassonografia do aparelho reprodutivo, os testículos se en-

contravam em topografia normal, dentro do escroto, onde foram visibilizadas duas grandes formações de contornos irregulares, grosseiras, heterogêneas, moderadamente vascularizadas ao DOPPLER de amplitude: a mais caudal medindo 7,40cm por 4,88cm e a mais cranial medindo 8,16cm por 5,06 cm apresentando áreas císticas, anecogênicas de até 0,76 cm de diâmetro. Também foram visibilizadas algumas áreas ovaladas, hiperecogênicas produtoras de sombra acústica, sendo presuntivo de calcificação. Observaram-se também áreas nodulares de maior ecogênicidade, entremeadas ao parênquima e mergulhadas em grande quantidade de conteúdo de alta celularidade. O eletrocardiograma apresentou alterações sugestivas de sobrecarga atrial esquerda, normal na idade do paciente atendido.

No exame macroscópico da peça cirúrgica o testículo esquerdo apresentava-se atrofiado e o testículo direito continha duas massas: a primeira apresentava dimensões em 4,1x2,6x3,1 cm, brancacenta, firme e com superfície irregular. Ao corte, brancacento, com área focal amarronzada, compacta. A segunda massa dimensionada em 3,3 x 2,0 x 1,2 cm com superfície irregular, brancacenta com área interna extensa e amarronzada, área central acinzentada.

Ao exame microscópico, a primeira massa, verificou-se proliferação neoplásica de células germinativas em arranjo intratubular de crescimento expansivo e compressivo, moderadamente pleomórficas, citoplasma escasso, com bordos indistintos e eosinófilico e núcleo oval a redondo, com cromatina granulosa a vesiculada e nucléolos, por vezes, duplos e evidentes. Apresentando índice mitótico baixo. Estroma escasso. Ao lado, havia incontáveis estruturas tubulares mostrando degeneração e atrofia com espessamento dos septos intratubulares e edema discreto. Espessamento da túnica albugínea. O parênquima epididimário, mostrou discreta fibroplasia e presença de cistos intraepiteliais. Características essas compatíveis com as de um seminoma descritas por [6].

A segunda massa apresentou formação circunscrita constituída de células intersticiais de Leydig neoplásicas delimitadas por fino estroma conjuntivo, mas em sua maior extensão acompanhadas, predominantemente, por pequenas estruturas vasculares discretamente dilatadas e uma única fortemente cística preenchida com sangue. Os componentes celulares são redondos ou poliédricos com abundante citoplasma eosinófilico, que varia de finamente vacuolizado a presença de vacúolos maiores. Os núcleos eram pequenos, arredondados geralmente hiper cromáticos contendo nucléolo único e discreto pleomorfismo nuclear. Apresentando índice mitótico baixo e estroma escasso. Os achados microscópicos do leydigocitoma da segunda massa divergem do relatado por [7].

Após 10 dias o animal retornou para revisão e retirada dos pontos, no qual apresentou edema moderado e um hematoma na região da incisão, porém a mesma apresentava boa cicatrização. Logo o paciente teve alta médica.

Considerações Finais - De acordo com os dados obtidos confirmou-se a presença de formações neoplásicas distintas no mesmo testículo (seminoma intratubular acompanhada de uma degeneração testicular e leydigocitoma de padrão telangiectásico), com atrofia do testículo contralateral.

Referências bibliográficas

- [1] MOULTON, J.E. (Ed.). **Tumors in domestic animals**. 3.ed. Berkeley : University of California, 1990. p.672.
- [2] KENNEDY, P.C.; CULLEN, J.M.; EDWARDS, J.F. et al. **Histological classification of tumors of the genital system of domestic animals**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1998.
- [3] ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. v. 1, p. 1324.
- [4] CARLTON, W. W.; MC GAVIN, M. D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2ª edição. Porto Alegre. Editora Artmed. 579p. 1998.
- [5] ROSOLEM, M. C.; ROMERO, D. C.; PACHECO, A. D.; SCHWEIGERT, A.; ROZZA, D. B. Tumor de células de leydig e tumor das células de sertoli em cão não criptorquida. Relato de caso. **Anais do IV CONCCEPAR**, 2011.
- [6] ALVES, N. D.; MELO, D. E. B.; PEREIRA, R. H. M. A.; CARVALHO C. G.; ACCIOLY, M. P.; MATOS, M. M.; QUEIROZ, I. V.; AMÓRA, S. S. A.; FERNANDES, L. G.; FILGUEIRA, F. G. F. Seminoma intratubular em canino: relato de caso. *Combravet*. **Anais**. 2008.
- [7] SILVA, W. P. N.; RECH, F.; ARAÚJO, E. B.; FRANÇA, F. K. A.; FILHO ROLIM, S. T.; RIBEIRO, H. F. L. Leydigocitoma e Seminoma concomitantes em cão – relato de caso. *Acta Veterinaria Brasilica*, **Anais do VII CONERA**, v.8, Supl. 2, 2014.

Avaliação de precocidade sexual em touros jovens suplementados da raça Nelore

Fernanda Battistotti Barbosa¹

Luiz Carlos Cesar Costa Filho²

Ellen Caroline Soligo²

Alini Sillva Peixoto²

Tallita Silva de Assis Sales³

Eduardo Antonio de Almeida Rossignolo⁴

Joana Carolina Trindade Barbosa⁴

Marcos Vargas da Silveira³

Eliane Vianna Costa e Silva⁵

*Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul, GERA-MS/CNPq, Campo Grande, MS

Abstract: The determination of sexual precocity in males, mainly zebu ones that have better adaptability to the tropical climate, is increasingly studied. The objective of the present study, was to evaluate the sexual precocity of young bulls of the Nelore breed and to evaluate the scrotal perimeter as a predictor of precocity. A total of 1.007 animals were evaluated. It was verified through the evaluations, that the average age at puberty of the animals evaluated was 14.99 ± 0.06 months, with a mean weight of 390.94 ± 1.67 kg and a mean scrotal perimeter of 27.50 ± 0.10 cm. Through the obtained results, it can be concluded that the scrotal perimeter measurement alone is not the best parameter to evaluate the sexual precocity of males. And the collection of semen proved to be an effective method to determinate puberty and aided in the identification of sexually precocious animals.

Keywords: reproduction; puberty; semen.

Palavras-chave: reprodução; puberdade; sêmen.

Introdução - O desempenho reprodutivo é um fator de grande importância para a produção e melhoramento genético de bovinos. A determinação da precocidade sexual em machos, principalmente zebuínos que possuem melhor adaptabilidade ao clima tropical, é cada vez mais estudada. Pois a seleção de animais sexualmente precoces diminui a idade de entrada em reprodução, e conseqüentemente, diminuição do intervalo entre gerações acelerando o melhoramento genético, o que resulta em maior lucratividade [1]. Para iniciar a seleção de

¹ Programa de pós-graduação em Ciência Animal/UFMS; Campo Grande, Mato Grosso do Sul; email: fernandabattistotti@hotmail.com

² Médicos Veterinários

³ Programa de pós-graduação em Ciências Veterinárias/UFMS

⁴ Acadêmicos de graduação em Medicina Veterinária/UFMS

⁵ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; email: eliane.silva@ufms.br

bovinos sexualmente precoces, se faz necessário identificar a idade à puberdade dos animais, que é atingida quando há capacidade de liberação de gametas férteis e manifestação do comportamento sexual [2]. Quanto ao desempenho sexual de bovinos, a medida mais utilizada com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, é a avaliação do perímetro escrotal (PE), especialmente devido à facilidade de mensuração e herdabilidade média a alta [3]. Há evidências que a medida de PE está correlacionada geneticamente com características físicas e morfológicas do sêmen durante a puberdade e no início da maturidade sexual [4]. Além disso, esse parâmetro apresenta estreita relação com as características reprodutivas das fêmeas aparentadas a estes machos, como a idade à primeira cobertura e idade ao primeiro parto (IPP) [5]. Apesar da importância da precocidade sexual, ainda existem grandes dificuldades quanto a sua determinação, principalmente em machos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a precocidade sexual de touros jovens da raça Nelore, além de avaliar o perímetro escrotal como preditor de precocidade.

Material e Métodos - O estudo foi realizado na Fazenda Remanso, localizada no município de Rio Brillhante, Mato Grosso Sul, Brasil (latitude 21°45'15" S, longitude 54°25'50" W). Foram avaliados 1.007 animais, da raça Nelore, com idade entre nove a dezessete meses de idade, por um período de um ano. Os animais foram mantidos à pasto de *Brachiaria brizantha* cv. *Marandu*, em terra consorciada de lavoura-pecuária. Houve suplementação durante todo o período de estudo com uma ração composta por milho (75%) e farelo de soja (25%). A relação ração/ peso vivo/dia utilizada foi de 1%. O estudo teve início em Agosto de 2016, e os animais foram submetidos a outras três avaliações, com intervalo de 90 dias entre elas. Durante as avaliações, realizou-se pesagem corporal e aferição do perímetro escrotal (PE). Houve tentativa de coleta de sêmen por meio da eletroejaculação, naqueles animais que apresentavam medidas de PE acima de 19 cm. Foram feitas amostras contendo 20µl de sêmen misturados a 1 ml de formol salina a 10%, dos tourinhos que apresentaram no mínimo 10% de motilidade no ejaculado. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ/UFMS para determinação da concentração espermática. Foram considerados púberes, os animais que apresentaram motilidade progressiva $\geq 10\%$ e no mínimo 50 milhões de espermatozoides totais no ejaculado [6]. Os tourinhos foram classificados de acordo com a idade à puberdade em: Superprecoces (SP) até 14 meses, precoces (P) até 17 meses e tradicionais (T) acima de 17 meses de idade. As variáveis: perímetro escrotal, peso e idade à puberdade, foram submetidas à análise de variância pelo programa SAS, considerando os efeitos fixos de classe de precocidade e ordem de coleta (1ª coleta, 2ª coleta, 3ª coleta e 4ª coleta). As médias foram comparadas pelo teste t de *student*. Todas as análises com $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

Resultados e Discussão - Verificou-se através das avaliações, que a idade média à puberdade dos animais avaliados foi de $14,99 \pm 0,06$ meses, com peso médio de $390,94 \pm 1,67$ kg e perímetro escrotal médio de $27,50 \pm 0,10$ cm. A idade à puberdade média dos animais do presente estudo corrobora com dados encontrados na literatura brasileira, na qual os animais da raça

Nelore podem apresentar idade à puberdade entre 10 a 16 meses de idade [7]. O perímetro escrotal médio à idade à puberdade dos animais avaliados apresentou-se muito parecido com o PE médio de 28,29 cm de tourinhos Nelores à puberdade [8]. Estudos demonstram que testículo mais alongado, e geralmente com menor PE, apresenta maior quantidade de espermatozoides/ml de ejaculado. Além disso, por aumentar a superfície de contato do testículo com o meio ambiente, facilita a termorregulação, justificando a melhor qualidade de sêmen [9].

Tabela 1. Perímetro escrotal e peso (Médias \pm DP) de acordo com a classe de precocidade sexual no momento da puberdade de bezerras Nelore.

| Classe de Precocidade | Perímetro escrotal (cm) | Peso (kg) |
|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Superprecoce (SP) | 30,03 \pm 0,18 ^c | 404,32 \pm 3,38 ^c |
| Precoce (P) | 31,17 \pm 0,13 ^b | 450,08 \pm 2,26 ^b |
| Tradicional (T) | 31,91 \pm 0,20 ^a | 487,02 \pm 2,96 ^a |

Médias com letras diferentes, diferiram estatisticamente pelo teste t *student*.

Por ser uma característica considerada de alta herdabilidade [10], a idade à puberdade pode ser reduzida através da seleção. A puberdade está diretamente relacionada à fatores genéticos, condições nutricionais pré e pós-desmama, manejo e até linhagens dentro de uma raça [11]. O perímetro escrotal é uma característica de grande importância para a seleção de touros, pois indica a capacidade de produção espermática de cada animal. Assim, quanto maior o perímetro escrotal, maior a produção espermática e consequentemente maior o número de ejaculados férteis [4,12]. Porém, foi constatados que animais que apresentaram maior PE, não foram necessariamente, os animais mais precoces. Notou-se ainda, que os animais classificados como superprecoces tiveram média de PE menor que os animais precoces e tardios, respectivamente. O que sugere que o perímetro escrotal pode não ser indicativo de puberdade. Os animais superprecoces quando comparados com os animais das classes precoce e tardio, apresentaram peso médio à puberdade de 45,76 e 82,70 quilos, respectivamente, a menos, demonstrando que os animais precoces e tardios, precisam de mais peso para entrar em puberdade, que os animais superprecoces. Esses dados reforçam que há um fator genético relacionado à característica de precocidade, já não houve interferência do fator nutrição nos resultados, visto que, os animais foram mantidos em seus grupos de contemporâneos e tiveram o mesmo manejo alimentar durante todo o período de estudo.

Considerações Finais - Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a aferição do perímetro escrotal por si só não é o melhor parâmetro para avaliar a precocidade sexual de machos. E a coleta de sêmen demonstrou-se um método eficaz para determinar a puberdade e ajudou na identificação de animais sexualmente precoces.

Referências Bibliográficas

[1] BARTH, A.D.; OMINSKI, K.H. The relationship between scrotal circumference at weaning and at one year of age in beef bulls. **The Canadian Veterinary Journal**, v.41, p.541-546, 2000.

- [2] HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed., p. 513. São Paulo, 2004.
- [3] SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; FREITAS, A.R. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1157-1165, 2002.
- [4] QUIRINO, C.R.; BERGMANN, J.A.G.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J.; PEREIRA, J.C.C. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. **Theriogenology**, v.52, p.25-34, 1999.
- [5] SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; PINHO, R.O. Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.3-13, 2013.
- [6] WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Pubertal behaviour and pubertal characteristics of beef bulls on high nutrition allowance. **Journal of Animal Science**, v.224, p. 761-765, 1965.
- [7] COSTA E SILVA, E.V.; FERREIRA, B.X.; QUEIROZ, V.L.D.; COSTA FILHO, L.C.C.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Precocidade sexual de touros a campo em condições tropicais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.97-104, 2013.
- [8] QUEIROZ, V. L. D. Hormônio anti-Mulleriano e puberdade em machos Nelore. 2014. 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Faculdade de medicina veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.
- [9] UNANIAN, M.M., SILVA A.E.D.F, MC MANUS, C. et al. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.136-144, 2000.
- [10] MacNEIL, M.D.; CUNDIFF, L.V.; DINKEL, C.A. et al. Genetic correlations among sex-limited traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1171, 1984.
- [11] GARCIA, J.M.; PINHEIRO, L.E.L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. **Ars Veterinária**, v.3, p.47-53, 1987.
- [12] BERGMANN, J.A.G. Seleção de zebuínos para precocidade sexual. In: I Simpósio de produção de gado de corte, Viçosa-MG. **Anais SRGC**: Viçosa, p.51-64, 1999.

Agradecimentos: Ao grupo Genética Aditiva pelo apoio na pesquisa e a Fundect apoio financeiro para pesquisa.

Ação da quercetina sobre a qualidade espermática de bovinos avaliados por microscopia eletrônica de varredura

Stella Maris Teobaldo Tironi¹
Anna Raquel Grimas Almeida¹
Talitha Fernandes Stefanello²
Celso Vataru Nakamura²
Antonio Campanha Martinez¹
acmartinez@uem.br

Abstract: Semen freezing is a procedure widely used in assisted reproduction techniques with the aim of providing the spermatozoa for the fertilization process. However, the semen freezing process promotes a situation of oxidative stress that diminishes the spermatozoid capacity of fertilization of oocytes after freezing. In this way, oxidant is used to try to prevent the effects of this oxidation. Under the conditions of this study, with scanning microscopy analysis, poor sperm tail fixation can be observed in all samples. However, regarding the influence of quercetin on the sperm morphology of thawed semen, the response was null.

Keywords: cryopreservation; semen; fertilization.

Palavras-chave: criopreservação; semen; fertilização.

Introdução - A congelação seminal é um procedimento utilizado amplamente nas técnicas de reprodução assistida com o desígnio de prover os espermatozoides para o processo de fertilização. Porém o processo promove mudanças na estrutura, função e fisiologia dessas células. Isto pode ocorrer devido ao estresse osmótico, choque pela baixa temperatura, formação de cristais de gelo, estresse oxidativo, produção excessiva de naturezas reativas ao oxigênio (EROs), uma alteração nos sistemas de defesa antioxidante ou combinações dessas condições [1, 2]. A oxidação em condições normais promove a maturação a capacitação, reação acrossomal e fusão espermato - oocitária [3]. Entretanto no momento em que oxidação extrapola a defesa antioxidante da célula, desencadeia o estresse oxidativo, prejudicando a função da célula espermática [4]. Na busca de diminuir as consequências deste processo diferentes substâncias são adicionadas durante a criopreservação. A microscopia eletrônica de varredura pode ser utilizada para avaliar as células espermáticas superficialmente, observando características microestruturais, de aparência tridimensional e com alta resolução [5]. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar se a quercetina possui capacidade antioxidante perante a morfologia espermática no sêmen descongelado de bovinos.

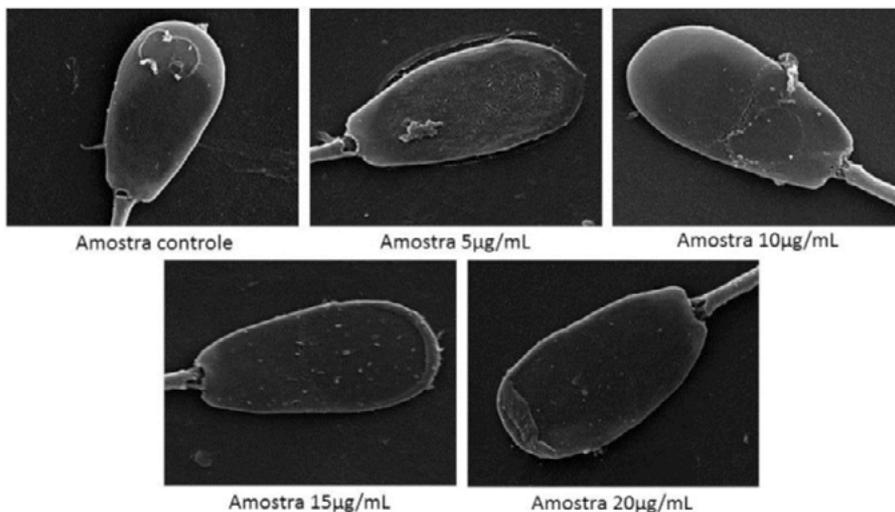
¹ Campus Umuarama - Universidade Estadual de Maringá

² Campus Maringá - Universidade Estadual de Maringá

Material e Métodos - Para a realização desse estudo, foram utilizados três touros com idade entre dois e três anos, mantidos no setor de Reprodução Animal, do Campus Fazenda da Universidade Estadual de Maringá, Umuarama - PR. Os touros foram alimentados com silagem de milho, sal mineral e água ad libitum. A coleta seminal foi realizada após higienização do prepúcio com solução de ringer com lactato, já que o pH dessa solução se aproxima ao natural proporcionado pela flora local, com o auxílio do eletroejaculador. As 3 amostras foram homogenizadas, formando um pool de sêmen. A concentração espermática foi mensurada, através da contagem espermática pela câmara de Newbauer, e as amostras foram diluídas no meio Tris gema glicerol contendo a quercetina. Feito isso, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5mL, contendo 20×10^6 espermatozoides por palheta e submetidas à congelamento. Os 5 grupos testados diferem quanto às proporções do antioxidante adicionado, sendo eles: 0, 5, 10, 15 e $20 \mu\text{g}$ de quercetina por mL de diluente. A metodologia para a realização da Microscopia eletrônica de varredura seguiu o protocolo apresentado por [6] e [7], com centrifugação adaptada para força gravitacional de 1200G e tempo de cinco minutos, a fim de evitar decapitação das células espermáticas. Sendo assim, as amostras foram descongeladas, centrifugadas, fixadas em glutaraldeído, desidratadas em série alcoólica, secas por ponto crítico (Critical Point Dryer CPD-030, Bal-tec®) e metalizadas. Depois disso, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura, onde foram analisadas qualitativamente. Através dessa análise, as células espermáticas foram avaliadas quanto à integridade da membrana, presença de acrossoma, fixação ou ausência da cauda, presença de gota citoplasmática, defeitos de cauda.

Resultados e Discussão - As amostras não resultaram diferenças na sua morfologia de superfície. Entretanto, muitas células espermáticas apresentavam falhas na conexão entre cauda e cabeça, independente da concentração de antioxidante do grupo, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Avaliação das amostras pela microscopia eletrônica de varredura.



A microscopia eletrônica de varredura pode ser utilizada para avaliar as células espermáticas superficialmente, observando características micro estruturais, de aparência tridimensional e com alta resolução [5]. Ela tem o objetivo de avaliar superficialmente detalhes finos, pequenos e tridimensionais [6,8]. Sendo assim, as amostras não obtiveram resultado significativo, quanto a sua morfologia de superfície. Isso pode ser explicado pois essa técnica possui limitações em detectar alterações na membrana decorrentes do processo oxidativo.

Conclusão - Nas condições desse estudo, com a análise de microscopia de varredura, pode-se observar má fixação da cauda do espermatozoide em todas as amostras. Entretanto, quanto à influência da quercetina sobre a morfologia espermática do sêmen descongelado, a resposta foi nula.

Referencias Bibliográficas

- [1] VENKATESH, Sundararajan et al. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reproductive Sciences*, v. 18, n. 10, p. 1005-1013, 2011.
- [2] GANGWAR, Chetna et al. Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen. *Animal reproduction science*, 2018.
- [3] SAALU, LC. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.13, n.9, p.413-422, 2010.
- [4] MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 21, p. 80-89, 2006.
- [5] GOMES, D. S.; TIRONI, S. M. T.; MARTINEZ, A. C. Uso da microscopia eletrônica de varredura na medicina veterinária. II Simpósio da pós-graduação em produção sustentável e saúde animal. Umuarama, 2017.
- [6] GRIMSTONE, A.V. O Microscópio Eletrônico em Biologia. Editora Pedagógica e Universidade Ltda; Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 1980.
- [7] DEDAVID, B.A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G.. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.
- [8] CASTRO, L. A. S. Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura. Luis Antônio Suita de Castro. - Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2001.

Agradecimentos: CAPES. FINEP.

Uso da quercetina como antioxidante na criopreservação de sêmen de touros *Bos indicus*

Stella Maris Teobaldo Tironi¹
Anna Raquel Grimas Almeida¹
Flávio Augusto Vicente Seixas¹
Gentil Vanini de Moraes¹
Antonio Campanha Martinez¹
acmartinez@uem.br

Abstract: Semen cryopreservation is an indispensable tool in the programs of artificial insemination, transfer and in vitro production of embryos. but there are some adversities during the cryopreservation process that reduce sperm capacity at the time of oocyte fertilization. Factors such as thermal shock due to intracellular and extracellular ice formation, cell dehydration and osmotic stress are the main causes of problems triggered during cryopreservation, in addition to the oxidative stress caused by the whole process. In this way, this study proposed the use of quercetin as antioxidant in the freezing process, which concluded that cell viability increases according to the increase in quercetin concentration, promoting greater protection of spermatozoa.

Keywords: freezing; oxidation; spermatozoa.

Palavras-chave: congelamento; espermatozoides; oxidação.

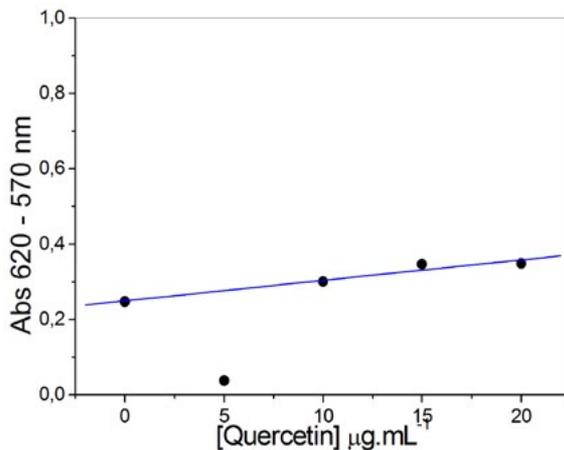
Introdução - A congelamento de sêmen tem importante papel para disseminação do potencial reprodutivo de animais de alto valor genético, é uma ferramenta indispensável nos programas de inseminação artificial, transferência e produção in vitro de embriões. Porém ainda existem algumas adversidades durante o processo de criopreservação que reduzem a capacidade dos espermatozoides no momento da fecundação do ócito. Determinados fatores como o choque térmico devido a formação do gelo intracelular e extracelular, desidratação celular e estresse osmótico são as principais causas de problemas desencadeados durante a criopreservação, além do estresse oxidativo causado por todo o processo [1]. Quando em concentrações fisiológicas, a oxidação é responsável por processos como maturação, capacitação, reação acrossomal e fusão espermato-ocitária [2]. Contudo, quando a oxidação excede a defesa antioxidante da célula, origina-se o estresse oxidativo [3]. Desta maneira alguns estudos citam o uso de antioxidantes com o objetivo de diminuir os efeitos deletérios causados. Entre tantos a quercetina é capaz de reduzir este estresse melhorando a capacidade espermática após o congelamento [4]. O objetivo deste estudo foi avaliar eficiência da quercetina no processo de congelamento do sêmen quanto a sua capacidade de antioxidante sobre os espermatozoides.

¹ Campus Umuarama - Universidade Estadual de Maringá

Material e Métodos - Foram realizadas as coletas de três touros da raça Brahman, com idade entre dois e três anos, mantidos no setor de Reprodução Animal do Campus Fazenda da UEM, Umuarama – PR. Os touros foram alimentados com silagem de milho, sal mineral e água *ad libitum* e foram previamente submetidos a exame andrológico [5]. Antes da coleta os animais receberam antisepsia do prepúcio com 500 mL de solução de ringer lactato, em seguida foi realizada uma única coleta seminal, com auxílio de eletroejaculador. As 3 amostras foram homogenizadas, formando um *pool* de sêmen que foi diluído em meio Tris-Gema, já adicionado de quercetina para cada tratamento, e concentração espermática igual a 20.000.000 de espermatozoides/mL [6]. Os 5 grupos testados foram: 0, 5, 10, 15 e 20 µg de quercetina por mL de diluente. Depois disso, as palhetas foram refrigeradas e congeladas em nitrogênio líquido. Foi realizado o teste de NBT, o sal foi dissolvido em solução PBS (solução salina fosfatada) 10 Mm, com pH 7,5, contendo 1,5% de DMSO (dimetilsulfóxido) com concentração final de 1mg/mL. Em seguida, 250 µL de sêmen de cada amostra + 250 µL de PBS com DMSO foram adicionados na placa de 24 poços. Em seguida a placa foi levada em banho maria à 37°C, onde ficou por 1h sob agitação. Passado esse tempo, as amostras foram centrifugadas e lavadas duas vezes com velocidade de 1300 rpm, (300 G) durante 10 min, utilizando 250 µL de solução PBS + DMSO (Centrífuga MTD III PLUS, ITR®). Por fim, as células e os cristais que ficaram no microtubo, foram diluídas em 400 µL de KOH (hidróxido de potássio) 2 Mol diluído em DMSO previamente. As amostras descansaram por duas horas e, após isso, foram avaliadas em Espectrofotômetro de Varredura Shimadzu 1600 -PC, onde a densidade óptica era medida em comprimento de onda de 620 nm contra 570 nm, seguindo a metodologia proposta por [7]. Os resultados dos ensaios foram analisados por meio de teste-*t* comparando duas populações (controle e tratado) com variações independentes, dentro de um nível de significância de 5% ($p>0,05$), por meio do programa Origin-6.

Resultados e Discussão - Os resultados obtidos pelo teste do NBT são mostrados na figura 1.

Figura 1. Resultado do teste do NBT em cada concentração de quercetina com absorvância em 620 contra 570 nm.



O coeficiente angular da reta obtida por essa mensuração de absorbância foi 0,005, ou seja, para cada μg de quercetina, há um aumento na absorbância de 0,005. Sendo assim, o resultado com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de quercetina foi significativamente maior que o controle (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): $p < 0,05$. O teste nitroblue tetrazolium (NBT) avalia o sequestro do radical O_2^- , através da mudança da coloração amarela para um tom púrpura dos cristais que se formam com a oxidação [8]. Ou seja, quanto mais a célula está ativa, maior a oxidação [9].

Conclusão - Pode-se concluir que a viabilidade celular aumenta proporcionalmente à concentração de quercetina, ou seja, a quercetina possui capacidade de proteção antioxidante sobre os espermatozoides.

Referências Bibliográficas

- [1] NAGY S, HALLAP T, JOHANNISSON A, RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, v. 80, p. 225-35, 2004.
- [2] SAALU, LC. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.13, n.9, p.413-422, 2010.
- [3] MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 21, p. 80-89, 2006.
- [4] SEIFI-JAMADI, A., KOHRAM, H., ZAREH-SHAHNE, A., DEHGHANIZADEH, P., E AHMAD, E. Efeito de várias concentrações de hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado na capacidade de congelamento de esperma de garanhões Turkman. *Anim Reprod Sci*, v. 170, p. 108-113, 2016.
- [5] COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte. 2013. 104p.
- [6] HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.
- [7] TVRDÁ, E.; KOVÁČIK, A.; TUŠIMOVÁ, E.; MASSÁNYI, P.; LUKÁČ, N. Resveratrol offers protection to oxidative stress induced by ferrous ascorbate in bovine spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 50, n. 14, p. 1440-1451, 2015.
- [8] DA SILVA, J. M. R.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITJAVILAT, S.; J. *Agric. Food Chem*. 39, 1549, 1991.
- [9] KANEKO, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego. 932p, 2008.

Agradecimentos: CAPES.

Sazonalidade e qualidade de sêmen criopreservado de touros de diferentes genótipos em Centrais de coleta e processamento

Tallita Silva de Assis-Sales¹

Fernanda Battistotti Barbosa²

Joana Carolina Trindade Barbosa³

Caroline Carvalho de Oliveira³

Marcos Vargas da Silveira¹

Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo³

Neimar Correa Severo⁴

Eliane Vianna da Costa e Silva⁵

*Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul, GERA-MS/CNPq, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

Abstract: This experiment intends studies the effect of the seasons on the quality of the semen in different genotypes of bulls. Sixteen bulls Nelore, Girolando and Angus were evaluated in a seminal collection routine. Semen quality and ejaculate freezing were monitored for 12 months. In addition to climatic variables throughout the period are registred by temperature and humidity confort index (THI), it was calculated 10, 20, 30, 45, 60 and 70 days prior to semen collection: THI0, THI10, THI20, THI30, THI45, THI60 andTHI70, respectively. Seasonal thermal variations affected the seminal quality and the number of doses of bulls of different genotypes maintained in the CCPS routine. The seasons influenced the number of doses produced differently among genotypes: Nelore, Girolando and Angus presented better use of doses in summer, autumn and winter, respectively, when THI was considered 30 days before collection.

Keywords: bovine; environment; heat stress.

Palavras-chave: ambiente; bovino; estresse por calor.

Introdução - O equilíbrio térmico de touros reprodutores pode ser garantido em uma faixa de temperatura favorável denominada Zona de conforto térmico (ZTC) [1]. Em bovinos, o aumento da temperatura pode acarretar disfunção celular causando prejuízo na produção de leite, desenvolvimento fetal e a qualidade espermática [2]. O estresse térmico pode interferir na espermatogênese alterando motilidade, vigor, volume e qualidade morfológica [3].

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS, e-mail: tallitaassis@hotmail.com

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS

³ Acadêmicos de graduação em Medicina Veterinária / UFMS

⁴ Médico Veterinário, Alta Genetics, Uberaba, MG

⁵ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e-mail: eliane.silva@ufms.br

Estudos mostraram que o estresse por calor afeta mais animais *Bos taurus* se comparado a *Bos indicus*[4]. Zebuínos possuem capacidade de termorregulação superior a raças europeias por apresentar produção de calor reduzida, devido ao fato de seus tecidos apresentarem resistência em aquecer o fluxo a partir do interior corporal para a pele ser mais baixa sob temperaturas elevadas[5]. O presente trabalho pretende avaliar o efeito das variações climáticas sazonais sobre a produtividade de touros de diferentes genótipos sob regime de coleta de sêmen em uma Central de coleta e processamento de sêmen (CCPS).

Materiais e métodos - O Estudo foi realizado em uma CCPS, situada na latitude sul 19°69'82", longitude oeste 47°99'96". Foram avaliados dezesseis touros dos genótipos: Nelore, Girolando e Angus, mantidos em rotina de coleta e processamento de sêmen.

A qualidade seminal e congelabilidade do ejaculado foi acompanhada por 12 meses, no período de janeiro a dezembro/17 bem como as variáveis climáticas em todo o período. As coletas dos parâmetros microclimáticos (temperatura de bulbo seco e umidade relativa do ar e velocidade do vento) foram obtidas diariamente por meio de termohigrômetros programados para registros com intervalos de 60 minutos. A temperatura de globo negro registrada por termômetro de globo adaptado, segundo modelo proposto por Souza et al. (2002) [6]. Os equipamentos foram colocados nos piquetes. Para avaliação da condição de conforto térmico animal, foi calculado, a partir dos dados microclimáticos, o Índice de Temperatura de Globo e Umidade (ITU), proposto por Buffington et al. (1981) [8]: $ITU = tgn + 0,36tbu + 41,5$ em que: tgn: temperatura de globo negro (°C); tbu: temperatura de bulbo úmido (°C). Os valores de ITU, de acordo com Baêta (1985) foram classificados pelo National Weather Service em: situação de: conforto (abaixo de 74), alerta (74 a 79), perigo (79 a 84) e emergência (acima de 84). Calculou-se: ITU0 - ITU no dia da coleta, ITU10, ITU20, ITU30, ITU45 e ITU60 calculados 10, 20, 30, 45, 60 e 70 dias antes da coleta. A qualidade seminal do ejaculado fresco foi acompanhada na rotina de coleta, seguindo-se os critérios estabelecidos pelo Manual de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). Para cada ejaculado obtido registrou-se volume (Vol, em mL), motilidade (MOT, %), vigor (VIG, 0-5), concentração / mL (CONC) e concentração total (CONCTT). Após a descongelação uma dose de cada partida produzida no período experimental foi avaliada quanto a motilidade (MOT-PD), vigor (VIG-PD), morfologia espermática (expressa em porcentagem de defeitos maiores - DMA, menores - DMe, totais - DTT e normais - NOR), além de motilidade (MOT-TTR) e vigor (VIG-TTR) pós- teste de termoresistência rápido (TTR). Registrou-se ainda o número de doses obtidas (DOSE), as razões de descarte e de forma binomial a aprovação (1) ou reprovação de cada partida. As variáveis foram correlacionadas entre si por meio de correlação de Pearson. A frequência de aprovação das partidas foi comparada por teste de Qui-quadrado entre estações do ano. As médias de variáveis qualitativas de sêmen fresco e congelado foram comparadas por análise de variância considerando o efeito fixo de estação do ano e aprovação, tendo como co-variável o ITU0, ITU10, ITU20, ITU30, ITU45, ITU60 e ITU70. Médias foram comparadas por teste de t de *student* considerando o nível de significância de 5%. Realizou-se análise de regressão considerando os efeitos fixos de estação, ITU0, ITU10, ITU20, ITU30, ITU45, ITU70, nº de doses produzidas e qualidade seminal.

Resultados e Discussão - Houve influência das estações do ano sobre o número de doses na taxa de aprovação dos ejaculados, sendo que os Nelore apresentaram proporcionalmente melhor aproveitamento das doses no verão (46,47%), Girolando no outono (24,09%) e os animais da raça Angus, no inverno (34,79%). Chacur et al (2012) relataram aumento do volume/ml em touros Simental no verão. E no inverno observaram que touros Nelore pioraram as características morfológicas, o que coincide com nossos resultados. Alguns autores relataram que a alteração ocorrida pela exposição ao calor pode permanecer após oito semanas [4].



Figura 1. Distribuição das razões de aprovação das partidas de sêmen criopreservado produzidas, em diferentes estações do ano, por touros de diferentes genótipos mantidos em Central de coleta e processamento de sêmen (CCPS) no Cerrado Brasileiro.

As causas de rejeição alteraram no decorrer da estação em função do genótipo ($P < 0,05$). Em um estudo realizado por Vogler et al (1993) [8], através do insulação escrotal, obtiveram resultados em que a expressão de defeitos primários foi maior que de defeitos secundários e terciários. O número de doses produzidas e as causas de rejeição apresentaram alteração em função do ITU 30 dias antes da coleta. Este período coincide no processo espermatogênico com a meiose I, na fase de paquíteno [9].

A análise de regressão apresentou uma variação significativa das características de MOTPD ($R^2 = 0,3788$, $P = 0,0001$), VIGORPD ($R^2 = 0,2629$, $P = 0,0365$), MOTTTR ($R^2 = 0,3395$, $P = 0,0038$) e VIGORTTR ($R^2 = 0,3359$, $P = 0,0404$) em função do ITU aos 45 dias, período em que ocorre a estruturação de peça intermediária no processo espermatogênico.

Considerações Finais - As variações térmicas sazonais afetaram a qualidade seminal de touros de diferentes genótipos mantidos em rotina de CCPS. As estações do ano influenciaram no número de doses produzidas diferentemente entre genótipos: Nelore, Girolando e Angus apresentaram melhor aproveitamento de doses no verão, outono e inverno, respectivamente, quando se considerou o ITU 30 dias antes da coleta. Houve influência do ITU aos 45 dias da espermatogênese, afetando assim as características físicas do sêmen.

Referências Bibliográficas

- [1] PEREIRA, CCJ. **Fundamentos de bioclimatologia aplicados à produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2005, 195p.
- [2] WAITES, GMH. **Temperature regulation and the testis**. The testis. Academic Press; p.241-279; 1970.
- [3] CHACUR, MGM, MIZUSAKI, KT, SANTOS, FH. et al. Influência da estação do ano nas características do sêmen e na concentração de hormônios em touros Nelore e Simental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 64:3, 540-546, 2012.
- [4] HANSEN PJ, DOBBS KB, DENICOL, AC et al. Sex and the preimplantation embryo: implications of sexual dimorphism in the preimplantation period for maternal programming of embryonic development. **Cell and Tissue Research**, 363: 237-247, 2016.
- [5] HANSEN, PJ. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, 349-360p, 2004.
- [6] SOUZA, RRC. Efeitos ambientais e de grupos genéticos sobre características de produção de sêmen em touros mestiços (*Bos taurus* x *Bos indicus*). 59 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) - Instituto de Zootecnia; Nova Odessa; 2012.
- [7] BUFFINGTON, DE, COLAZZO-AROCHO, A, CATON, G.H. et al. Black globe humidity comfort index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. **Transaction of the American Society Agricultural Engineering**, 24: 4,711-714; 1981.
- [8] VOGLER, CJ, BAME, JH, DEJARNETTE, JM et al. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**. 40:1207-1219, 1993.
- [9] Setchell B.P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.** 114: 179-194, 1998.

Agradecimentos: à Central de Coleta e processamento de Sêmen Alta Genetics Ltda pelo apoio na pesquisa, à CAPES pela concessão de bolsa de mestrado e à FUNDECT pelo financiamento de pesquisa.

Estudo da morfologia espermática de ovinos pantaneiros em diferentes estações sob sistema extensivo

Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo¹
eduardo.rossignolo@gmail.com

Daniela de Braga¹

Joana Carolina Trindade Barbosa¹

Fernanda Battistotti Barbosa²

Tallita Silva de Assis³

Marcos Vargas da Silveira³

Fernando Alvarenga Reis⁴

Eliane Vianna da Costa e Silva⁵

Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul,
GERA-MS/CNPq - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Abstract: This work aimed to characterize the morphological pattern of the semen of this genetic group in dry and rainy season under field conditions. We used 35 animals raised in an extensive system, receiving only mineral supplementation. No significance was found in morphological parameters, as is already known for females of the same genetic group, thus being usable throughout the year. In short, the passing rate in the breeding soundness was 73.53%, not varying according to the season.

Keywords: andrological exam; seasonality; sperm defects.

Palavras-chave: Defeitos espermáticos; exame andrológico; sazonalidade.

Introdução - O exame andrológico tem o objetivo de diagnóstico de aptidão reprodutiva, para tal utiliza-se de alguns padrões de normalidade clínica de cada espécie e de acordo com a idade. Entretanto a literatura nacional disponível, o Manual Para Exame andrológico e Avaliação de Sêmen Animal [1], utiliza dados de grupamentos genéticos, sistema de produção e de clima distintos do estado de Mato Grosso do Sul.

A importância dos aspectos da morfologia espermática vem sendo demonstrada por diversos trabalhos na andrologia bovina. Que refletem em sistemas de pontuação aplicados a esta espécie, CAP, proposto por Fonseca et al. [2], parâmetros morfológicos dos espermato-

¹ Acadêmico do Curso de Medicina Veterinária e Bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias

⁴ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS

⁵ Docente FAMEZ/UFMS, eliane.silva@ufms.br

zoides correspondem em até 35% da avaliação. No entanto, em ovinos, há escolas com pensamento diverso do que se registra conceitualmente na andrologia ovina, como a Universidade de Ohio, que indica que reprodutores ovinos devem ter de 50 a 80% células normais, para serem aprovados neste critério.

Em regiões muito inóspitas como o Pantanal, a adaptação de animais e ou populações por meio de seleção natural, muitas vezes leva a formação de grupos que podem ser caracterizados como novas raças. No Pantanal matogrossense, os ovinos pantaneiros têm tido importância econômica cada vez maior, o que levou a união de pesquisadores de diferentes Instituições e criadores a se unirem e buscarem a homologação da raça frente ao MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Diversos estudos quanto a sua contribuição para o patrimônio genético, em que a adaptabilidade e rusticidade que compõem estes animais, e diante da oscilação pluviométrica macrorregional, buscaremos caracterização do padrão morfológico do sêmen deste grupo genético em estação seca e chuvosa sob condições de campo.

Material e Métodos - Os animais criados de forma extensiva, recebiam suplementação mineral *ad libitum*, mantidos em pastagens *Urocloua brizantha* cv. Marandu, oriundos da fazenda Modelo da Embrapa Gado de Corte, localizada no Município de Terenos – MS. Foram analisadas amostras provenientes de 35 animais em diferentes idades. Classificados em classes etárias: 6 (6 - 9 meses), 12 (10 a 16 meses), 20 (17 a 20 meses), 24 (21 a 32 meses), 36 (33 a 42 meses) e 48 (mais de 43 meses de idade).

As coletas aconteceram por uso do eletro-ejaculador. O ejaculado foi avaliado por único examinador, parâmetros como motilidade, turbilhonamento e vigor no momento seguinte a coleta, além de cor, odor, volume. Foram preparadas amostras para concentração, obedecendo a diluição de eleição 1/200 e material para morfologia em frasco *eppendorf* contendo 1,0ml DMpbs a 4% de formol salina e recebendo parte do ejaculado até turvar o meio. A avaliação de morfologia das células foi realizada pelo mesmo examinador em todas as amostras, por meio de preparação úmida avaliada sob microscopia de contraste de fase em objetiva de 100x, pH 3 sob óleo de imersão.

As coletas são referentes a exames andrológicos realizados entre os anos de 2014 e 2018. Os meses de estação seca foram abril e setembro e a estação chuvosa nos meses de outubro e novembro. Os animais foram, após o exame andrológico, classificados quanto a sua aptidão reprodutiva em aptos, aptos com restrição, inaptos temporários, inaptos definitivos.

A análise estatística foi feita por meio de análise de variância considerando os efeitos fixos de estação e faixa etária sobre as características de PE, motilidade (MOT), vigor (VIG), concentração/mL (CONC), defeitos maiores(DMa), defeitos menores(DMe) e totais (DTT), patologia de cabeça (PATcab), peça intermediária (PATPI) e cauda (PATcauda) e os defeitos individuais todos transformados em raiz quadrada de $x + 1$. As médias foram comparadas por meio de teste de Duncan entre faixas etárias e teste de t de *student* entre estação seca e chuvosa, considerando o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão - As variáveis de alteração morfológica espermática não diferiram nos diferentes períodos do ano, portanto assim como ocorre com fêmeas [3], os machos não apresentam sazonalidade reprodutiva na região (latitude 20° 33' 52.6" S longitude 54° 32' 09" W). As médias nas duas estações podem ser observadas na Tabela 1.

De acordo com o encontrado por Fumagalli et. al [4], as características estudadas apresentaram leve melhora na estação chuvosa, contudo em ambas as estações houve alta taxa de animais aptos, mostrando que os carneiros pantaneiros apresentam características andrológicas adequadas com potencial fértil.

Tabela 1. Características do ejaculado de carneiros Pantaneiros na estação seca e chuvosa

| | Estação Chuvosa | Estação Seca |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Motilidade | 58,80 ± 2,67 ^a | 59,50 ± 2,46 ^a |
| Vigor | 3,58 ± 0,11 ^a | 3,60 ± 0,16 ^b |
| Volume | 1,26 ± 0,22 | 1,56 ± 0,23 ^a |
| Defeitos menores | 4,78 ± 1,38 | 6,60 ± 1,67 ^a |
| Defeitos maiores | 16,22 ± 2,40 | 6,90 ± 1,26 ^a |
| Defeitos totais | 21,00 ± 2,73 | 13,50 ± 2,06 ^a |
| Defeitos de Cabeça | 1,64 ± 0,36 | 0,55 ± 0,21 |
| Defeitos de PI | 3,86 ± 1,24 | 4,35 ± 1,49 |
| Defeitos de Cauda | 10,97 ± 1,81 | 7,85 ± 1,73 |

Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente pelo teste t de student em nível de 5%.

A taxa de aprovação no exame andrológico foi de 73,53% dos carneiros pantaneiros e não variou em função da estação do ano ($P > 0,05$, $X^2 = 7,47$).

Em função da faixa etária somente o PE variou, o que já era esperado, bem como alterações espermáticas ligadas a maturidade, como Gota proximal e defeitos de cauda, $P < 0,05$.

Considerações Finais - Os carneiros pantaneiros apresentaram baixo percentual de alterações espermáticas demonstrando boa adaptabilidade ao ambiente.

Referências Bibliográficas

- [1]. CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3º. Belo Horizonte - MG: 2013; 2013.
- [2]. FONSECA VO, SANTOS NR, MALINSKI PR. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. **Rev Bras Reprodução Anim.** 21;2:36-9.
- [3]. Costa, JAA, Egito, AA, Barbosa-Ferreira, M et al. Ovelha pantaneira, um grupamento genético naturalizado do estado de mato grosso do sul, Brasil. IN:Congresso Americano Especialistas em Pequenos Ruminantes e Camélidos Sudam. Campo Grande MS; 2011. **Palestras...** p. 96-101.
- [4]. FUMAGALLI, MH. Avaliação das características andrológicas de carneiros do grupo genético pantaneiro nas estações seca e chuvosa. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção de Ruminantes) – Universidade Norte do Paraná. Arapongas PR; 2017. 44p

Agradecimentos: Embrapa gado de Corte, Fundect e CNPq pelo apoio financeiro.

Efeito de ambiente sobre a expressão da precocidade sexual em bovinos Nelore: dados preliminares

Marcos Vargas da Silveira¹
marcos.vetufms@gmail.com

Fernanda Battistotti Barbosa²

Luiz Carlos Cesar da Costa Filho²

Eduardo Antônio de Almeida Rossignolo³

Joanna Carolina Trindade Barbosa³

Tallita Silva de Assis¹

Willian Vaniel Alves dos Reis²

Eliane Vianna da Costa e Silva⁴

Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal de Mato Grosso do Sul, GERA-MS/CNPq. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Campo Grande, MS

Abstract: The objective of this study was to evaluate the influence of the environment on sexual precocity in Nelore males (n=856). They were evaluated in two farms with different feeding management. The collections started in July/16 (the animals have between 10-11 months old, and they were collected every 90 days, until April/17. The animals were distributed according to the sexual precocity class in early maturing (SP), puberty until 14 months of age; typical maturing (P), between 14-17 months; and late maturing (T), >17 months old. Comparatively, there was no statistical difference among the farms by the Chi-square test. Since the expression of T was superior in farm 2. Considering that the nutritional contribution of farm 1 is superior than 2, it can be inferred that nutrition influenced a greater expression of late animals. Food supplementation alternatives interfere with the percentage of T, the use of adequate supplementation is of importance for the expression of the precocity class characteristic.

Keywords: environment; puberty; Zebu.

Palavras-chave: ambiente; puberdade; zebu.

Introdução - O Brasil possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, composto por aproximadamente 211 milhões de cabeças [1]. Destes, cerca de 80% são animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), principalmente da raça Nelore. Embora animais Nelore apresentem adaptação aos sistemas de produção brasileiro, a precocidade sexual é um dos pontos que merecem maior atenção [2]. Com o grande interesse no gado zebuínico devido à sua melhor adaptação ao ambiente tropical, a determinação da puberdade é de extrema

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS.

² Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, FAMEZ/UFMS

³ Acadêmicos de graduação em Medicina Veterinária/UFMS

⁴ Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e-mail: eliane.silva@ufms.br

importância no sentido de identificar animais mais precoces sexualmente. Esta característica possui média herdabilidade, o que faz com que seja o foco principal de utilização nos programas de melhoramento genético no país [3]. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência do ambiente sobre a precocidade sexual em machos Nelore no Mato Grosso do Sul.

Material e Métodos - Todos os dados utilizados na pesquisa foram cedidos pela empresa Procriar, empresa parceira do grupo de pesquisas GERA – MS. Os animais Nelore utilizados no experimento estavam alocados em duas fazendas, todos da safra de 2015. A Fazenda 1 é localizada no município de Rio Brillhante, Mato Grosso do Sul (latitude 21° 45' 15" S, longitude 54° 25' 50" W). A fazenda 2 localizada no município de Anastácio, Mato Grosso do Sul (latitude 20° 34' 52" S, longitude 55° 58' 12" W).

Na fazenda 1 foram avaliados 795 machos Nelore (progênie de 21 touros identificados anteriormente, com no mínimo 5 filhos), mantidos à pasto, de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, em terra consorciada de lavoura-pecuária. Houve suplementação durante todo o período de estudo, com uma ração composta por milho (75%) e farelo de soja (25%). A relação ração/peso vivo/ dia utilizada foi de 1%. Na fazenda 2, foram avaliados 61 machos Nelore (progênie de 6 touros identificados anteriormente, com no mínimo 5 filhos), mantidos em pastagens de *Brachiaria* sp., sistema de pastejo contínuo, recebendo água *ad libitum*. A mineralização era fornecida diariamente, sendo oferecidos 700g/cabeça/dia de proteico energético com 25% de PB.

As coletas iniciaram quando os animais tinham idade entre 8-12 meses, no mês de agosto/16, a partir daí foram coletados a cada 3 meses, até maio/17. Considerou-se como coleta 1 - agosto/16; coleta 2 – novembro/16; coleta 3 – fevereiro/17 e coleta 4 – maio/17.

Todos os animais foram pesados, e submetidos a exame clínico andrológico: mensuração do perímetro escrotal (PE), tentativa de coleta seminal, avaliações microscópicas a campo dos aspectos físicos do sêmen.

Os tourinhos que apresentaram PE ≥ 19 cm foram submetidos à eletroejaculação para coleta de sêmen. Os animais que atingiram a concentração espermática total do ejaculado mínima de 50×10^6 e motilidade $\geq 10\%$ foram considerados púberes [4]. Definiu-se a classe de precocidade sexual em touros superprecoces (SP) incluindo-se aqueles que atingiram a puberdade até 14 meses de idade; precoces (P), aqueles que atingiram a puberdade entre 14 e 17 meses; e tardios (T), aqueles que alcançaram a puberdade após 17 meses.

A análise estatística comparou a frequência de precocidade sexual por fazenda e por pai utilizando-se o teste de Qui-quadrado. As variáveis dependentes: Idade a puberdade, perímetro escrotal, peso, densidade de pixel da imagem ultrassonográfica testicular, foram submetidos a análise de variância considerando o efeito fixo de classe de precocidade sexual, pai, avô materno e fazenda e a interação fazenda*pai. Para efeitos fixos significativos foi realizada a comparação de médias pelo teste de t ou tukey, considerando-se significativos valores de probabilidade inferiores a 5%.

Resultados e Discussão - Em uma análise comparativa entre as duas fazendas, não se observou diferença significativa ($X^2= 11.5447$, $P=0.0031$) pelo teste de Qui-quadrado. Sendo que a expressão

de animais tardios foi superior na fazenda 2 ($X^2= 8.9397$, $P=0.0028$) com 29,41% em quanto na fazenda 1, 14,15%. Na fazenda 1, os touros que tiveram as melhores avaliações de filhos foram o 3, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 26, 32 e 33, todos esses com menos de 15% de seus filhos considerados T. Dos touros avaliados, apenas três se repetiram na fazenda 2, pais 7, 9 e 10. Os touros 9 e 10 repetiram os resultados encontrados na fazenda 1, em que seus filhos foram superiores em termos de classe de precocidade, 60% e 50% da progênie SP, respectivamente, e nenhum classificado como tardio.

Considerando que o aporte nutricional da fazenda 1 é superior ao da fazenda 2 pode-se inferir que a nutrição influenciou uma maior expressão de animais tardios.

A baixa nutrição leva a diminuição de níveis de testosterona e adia a puberdade [5]. Resultados semelhantes foram obtidos por [6], machos Nelore que receberam alimentação suplementar foram mais pesados, apresentaram maior perímetro escrotal (PE) e concentrações séricas superiores de testosterona quando comparados aos animais não suplementados.

Os efeitos adversos da baixa nutrição no desenvolvimento e função sexual também podem ser inferidos a partir de estudos em que os touros receberam suplementação alimentar apenas durante a estação seca. Esta é uma prática comum em países tropicais onde os touros são criados em pastagens durante toda a vida e suplementados para minimizar a perda de peso quando a qualidade da pastagem é baixa, avaliando essa situação, [7], em seu experimento os machos suplementados apresentaram maior peso corporal, maiores testículos e pesos epididimário do que os touros que não foram suplementados. Os touros suplementados também apresentaram maior diâmetro dos túbulos seminíferos, total produção diária de espermatozoides e reservas espermáticas no epidídimo. Desta forma, há uma relação entre as características reprodutivas e a alimentação.

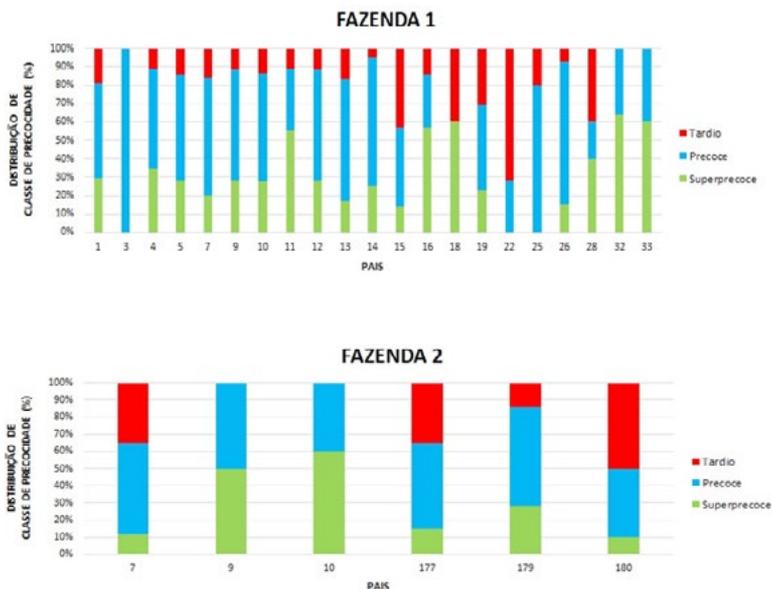


Figura 1. Distribuição de classe de precocidade de acordo com os pais em diferentes fazendas.

Considerações Finais - A progênie de um mesmo touro manifesta-se diferente entre propriedades, evidenciando o efeito de ambiente sobre as características de classe de precocidade. O uso de uma suplementação adequada é de importância para a expressão das características de precocidade.

Referências Bibliográficas

- [1] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/default.shtm>. Acesso em 15 de novembro de 2017.
- [2] ANDRADE, W.B.F. Associação Genética de Características de Qualidade de Carne e Precocidade sexual em Animais Nelore (*Bos indicus*). 2015. 28p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2015.
- [3] SIDDIQUI, M.A.R.; BHATTACHARJEE, J.; DAS, Z.C et al. Crossbred bull selection for bigger scrotum and shorter age at puberty with potentials for better quality semen. **Reproduction Domestic Animals**, v.43, n. 1, p.74–79. 2008.
- [4] WOLF, F.R.; ALMQUIST, J.O.; HALE, E.B. Prepuberal behaviour and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **J Anim Sci**, v. 24, n. 3, p. 761-765, 1965.
- [5] MANN, T.; ROWSON, L.E.; SHORT, R.V. et al. The relationship between nutrition and androgenic activity in pubescent twin calves, and the effect of orchitis. **J Endocrinol**, v. 38, n. 4, p. 455-468, 1967.
- [6] COSTA, M.F.O. **Precocidade sexual de bovinos da raça Nelore. IGF1, testosterona e motilidade espermática**. 1999, 67p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- [7] TEGEGNE, A.; ENTWISTLE, K. W.; MUKASA-MUGERWA, E. Gonadal and extragonadal sperm reserves and testicular histometric characteristics in Zebu and crossbred bulls: Effect of dry season nutritional supplementation. **Anim Reprod Sci**, v. 29, n. 1-2, p. 25- 33, 1992.

Agradecimentos: à Fundect pelo apoio financeiro, ao CNPq pelas Bolsa de Iniciação Científica, às fazendas São Judas Tadeu, à Genética Aditiva e à Procriar pela cessão dos dados.

Comparison of three commercial dilutors in the freezing of dog semen: sperm motility in the equilibrium period

Maitê Cardoso Coelho da Silva¹

Raiza Rocha Pereira¹

raiza_rochapereira@hotmail.com

Gediendson Ribeiro de Araujo¹

Pedro Nacib Jorge Neto²

Thyara de Deco-Souza¹

Abstract: The objective of this study was to analyze the canine semen motility in three commercial extender (CaniPlus Freeze, Triladyl and OptiXcell), during the period of prefreezing. As a result, we found that OptiXcell was the best at maintaining forward progressive motility and motility even after four hours of cooling, unlike the other two that lowered the initial value of motility, demonstrating the great potential of OptiXcell to be used as a cryopreservant extender in dogs.

Keywords: canine, chilled, semen

Resumo: Este estudo teve como objetivo analisar a motilidade do sêmen canino em três diluentes comerciais (CaniPlus Freeze, Triladyl e OptiXcell) durante o período de pré-congelamento. Como resultado, obtivemos que o OptiXcell foi o melhor em manter vigor e motilidade mesmo após quatro horas de resfriamento, diferente dos outros dois que diminuíram o valor inicial da motilidade, demonstrando seu grande potencial para ser utilizado como criopreservador em cães.

Palavras-chave: cão, refrigerado, sêmen

Introduction - The development of reproductive technologies in dogs is a field that grows due to the need to establish assisted reproduction practices for commercial kennels and also to serve as an experimental model for wild canids (ANGRIMANI *et al.*, 2013).

Therefore, the search for substances that can preserve the sperm membrane and that are practical in day-to-day use opened the door for different extenders to reach the market, and although there are several types of protocols for the production of extenders in the laboratory, the commercial extenders have the advantage of decreasing the time or errors in the preparation and consistency in the results. However, most of them require the addition of egg yolk, which increases sanitary risks, decreases life time outside the refrigerator and may prevents exports of frozen semen (FOROUZANFAR *et al.*, 2010).

The presence of egg yolk particles has also hindered seminal analysis because they can be confused with sperm in computerized analysis. As an alternative, liposomes consisting of

¹ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

² Universidade de São Paulo

egg yolk-specific phospholipids and soy lecithin have been used, and have also been shown to be efficient in cryopreserving semen of different species (GOERICKE-PESCH *et al.*, 2012). Some studies show that extenders that use soy lecithin or liposomes in their composition have good results, but in dogs there is still no consensus on their use (SÁNCHEZ-CALABUIG *et al.*, 2017; HE *et al.*, 2017).

The pre-freezing stabilization time recommended for canine semen is two hours (HIDALGO *et al.*, 2014), but this is very short in field situations (especially in wild free-living canids). In addition, some extenders (such as OptiXcell®) require at least three hours to stabilize the semen and ensure better cryoprotection to the sperm. Thus, increasing the pre freezing stabilization time not only increase the effectiveness of these extenders, but also would allow their use in the field.

The objective of this study to analyze the pre-freeze canine semen motility in three commercial extenders CaniPlus Freeze (Minitüb GmbH, Germany), Triladyl (Minitüb GmbH, Germany) and OptiXcell (IMV Technologies, France) during the pre-freezing equilibrium period.

Material and methods - For the present study, six dogs of different breeds (Labrador Retriever, Rottweiler and German Shepherd) were collected at a breeding kennel in Campo Grande - MS, through digital stimulation. Only the second fraction of the ejaculates with motility higher than 70% were used.

Each ejaculate was collected and initially processed in the kennel and then sent to the laboratory. Immediately after collection, semen was kept in a water bath at 37 ° C and evaluated for vigor, motility (subjective analysis) and concentration. Then it was divided into three commercial diluent (CaniPlus Freeze Triladyl and OptiXcell) to achieve a final concentration of 50×10^6 sperm/mL and kept at 5°C for two and four hours.

Sperm motility was evaluated subjectively (vigor and motility) at zero, two and four hours and by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA, Sperm Class Analyzer, SCA, Microptic, Spain), using settings for canids, at zero, two and four hours. Computerized analysis of nine ejaculates cooled for two hours and five ejaculates cooled for four hours were performed. For this evaluation, each tube containing the sperm diluted with extender were homogenized, an aliquot taken, warmed at 37°C, diluted (1:1) in TALP medium and loaded onto the 20 μm Leja slide (Leja, The Netherlands) for evaluation with the SCA.

The data were submitted to statistical analysis by GraphPad InStat (GraphPad Software Inc.) and the means were compared by the Turkey test. The significance level considered was $p < 0.05$.

Results and discussion - Due to the distance from the kennel to the laboratory it was not possible to analyze the sperm motility of fresh semen using SCA, which was analyzed only by the subjective method (vigor and motility). Among the analyzed media, only OptiXcell was able to maintain motility in relation to fresh semen ($p < 0.05$), during the different equilibrium

period (Table 1). There was, however, no change in vigor ($p < 0.05$) between the three extenders and in the equilibrium periods tested.

Table 1. Mean and standard deviation of the sperm motility analyzed by the subjective method in dog semen cooled in three different media for two hours and four hours ($n = 6$ and $N = 9$).

| Treatment | Fresh | Refrigerated 2 hours | | | Refrigerated 4 hours | | |
|-----------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| | | CaniPlus Freeze | OptiXcell | Triladyl | CaniPlus Freeze | OptiXcell | Triladyl |
| | Mean \pm SD | Mean \pm SD | Mean \pm SD | Mean \pm SD | Mean \pm SD | Mean \pm SD | Mean \pm SD |
| Vigor | 4 \pm 0,23 ^a | 3 \pm 0 ^a | 3 \pm 0 ^a | 3 \pm 0 ^a | 3 \pm 0 ^a | 3 \pm 0 ^a | 3 \pm 0 ^a |
| Motility | 83,85 \pm 6,50 ^a | 67,69 \pm 10,92 ^b | 79,23 \pm 2,77 ^a | 68,46 \pm 9,87 ^b | 65,55 \pm 12,36 ^b | 80 \pm 0 ^a | 66,67 \pm 11,18 ^b |

Different letters on the same line indicate statistical difference ($p < 0.05$)

CaniPlus Freeze and Triladyl extenders have egg yolks in their composition, while OptiXcell uses liposome as a cell protector, making making the medium a protein-free extender. The particles contained in the egg yolk end up interfering in the analysis of semen by the SCA and can be counted as cells of type d (immobile), due canids the sperm have dimensions similar to those. To minimize this error, a manual scan is performed to clear the “no sperm” before the final analysis by the program.

In the instructions for use of OptiXcell, three to five hours of cooling stabilization is recommended, but the superiority of this semen extender was detected with two hours of equilibrium since the progressive motility, both subjective and computerized, was superior ($p < 0.05$) to the other extenders tested (Table 2). Surprisingly, when the semen was equilibrated for four hours this difference was not detected in the computerized analysis ($p < 0.05$). Possibly this result was due to the small number of samples analyzed in this cooling time by the SCA, however, when analyzing the data in a crude way (Table 2), there is a considerable numerical difference in the progressive motility between the treatments. In addition, the results of the subjective analysis (Table 1) show superiority of OptiXcell over other extenders tested on sperm motility after four hours of equilibrium.

Table 2. Mean and standard deviation of progressive and total sperm motility analyzed by Sperm Class Analyzer in dog semen cooled in three different media for two hours ($n = 6$, $N = 9$) and four hours ($n = 5$, $N = 5$).

| Treatment | Motility – 2h | | | | Motility – 4h | | | |
|------------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | Progressive (%) | | Total (%) | | Progressive (%) | | Total (%) | |
| | Mean | \pm SD |
| CaniPlus Freeze | 39,58 ^a | \pm 17,99 | 73,83 ^a | \pm 24,98 | 36,63 ^a | \pm 13,93 | 74,05 ^a | \pm 18,25 |
| OptiXcell | 61,77 ^b | \pm 25,79 | 82,57 ^a | \pm 17,52 | 64,23 ^a | \pm 20,83 | 90,56 ^a | \pm 9,32 |
| Triladyl | 41,19 ^a | \pm 10,13 | 73,03 ^a | \pm 10,78 | 36,76 ^a | \pm 15,04 | 69,87 ^a | \pm 19,67 |

Different letters in the same column indicate statistical difference ($p < 0.05$)

Final Considerations - The present work represents preliminary results of a project that aims to evaluate the quality of cryopreserved dogs' semen using these three commercial media. The results so far indicate a superiority of OptiXcell in the maintenance of sperm motility during the two and four hour equilibration period. In addition, being protein-free, OptiXcell is more stable to be transported and thus more practical to be used in the field (mainly when it comes to more distant kennels or wild canids in free living). In this way this extender is a promising option to be used in the processing of semen of dogs.

References

- ANGRIMANI, D.S.R.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G.A.L.; REGAZZI, F. M., SILVA, L. C.G.; NICHÍ, M.; VANNUCHI, C.I. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.323-327, out./dec. 2013. Disponível em www.cbra.org.br
- FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, M.S.; OSTADOSSEINI, S.; HAIJAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, p 480-487, 2010
- GOERICKE-PESCH, S.; KLAUS, D.; FAILING, K.; WEHREND, A. Longevity of chilled canine semen comparing different extenders. **Animal Reproduction Science**, V. 135, p. 97-105, 2012
- HE, H.; YA-GUANG, T.; PENG, Z.; GUI-XUE, Z. Study on Semen Freezing Preservation of German Shepherd Dogs. **Journal of Northeast Agricultural University** (English Edition), v. 19, p. 53-57, dezembro, 2012.
- HIDALGO, M.; PORTERO, J. M.; DEMYDA-PEYRÁS, S., ORTIZ, I.; DORADO J. Cryopreservation of canine semen after cold storage in a Neopor box: effect of extender, centrifugation and storage time. **Veterinary Record**, v. 175(1), 20, 2014.
- SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; MAILLO, V., BELTRÁN-BREÑA, P.; MARTÍNEZ, J. F.; GALERA-CARRILLO, S.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F.; PÉREZ-CEREZALES, S. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soybean based extenders. **Reproductive Biology**, 2017.

Efeito da curcumina na criopreservação do sêmen equino

Raiza Rocha Pereira¹

Bianca Rodrigues Acacio²

Bruno Gomes Nogueira³

Bruno Milan⁴

Lucas Kohl Lander²

Pedro Henrique Pereira de Jesus²

Juan Andrés Colman Arredondo²

Breno Fernandes Barreto Sampaio⁵

Willian Vaniel Alves dos Reis⁴

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of different concentrations of curcumin on the quality of cryopreserved equine semen. The ejaculate of 2 stallions was used, each ejaculate was divided into 4 groups, 1 control group and other 3 groups according to the curcumin concentrations tested. Concentrations of 0.5 mM, 1.5 mM and 3 mM of curcumin were added to the semen freezing diluent, respectively. There was a statistically significant decrease in the sperm quality when compared to controls. There was a drastic fall in sperm motility and mitochondrial potential, and increase in membrane injury, and drop in overall sperm quality. We conclude that the concentrations of curcumin used in the cryopreservation of equine semen is deleterious to the spermatozoon.

Keywords: freezing; spermatozoon; stallion.

Palavras-chave: congelamento; espermatozoide; garanhão.

Introdução - O crescimento da equideocultura no cenário mundial, vem requerendo novos avanços na biotecnologia da reprodução. Uma das técnicas mais utilizadas é a criopreservação do sêmen equino, devido às vantagens da utilização de sêmen congelado. Porém, o processo de congelamento e descongelamento pode causar lesões irreversíveis ao espermatozoide, contribuindo significativamente para a redução da fertilidade.

Dentre os pontos críticos do processo de congelamento, destacam-se o estresse osmótico ao qual as células espermáticas são submetidas; exposição às baixas temperaturas, levando a mudança de fase e reorganização dos fosfolipídios da membrana plasmática (MP); e aumento

¹ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS; email: raiza_rochapereira@hotmail.com

² Laboratório Multiuso de Reprodução Animal / UFMS

³ Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS

⁴ Mestrando do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS

⁵ Docente da FAMEZ / UFMS, e-mail: breno.sampaio@ufms.com

da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à peroxidação lipídica (LPO). A produção de ROS é especialmente crítica, uma vez que o plasma seminal, que contém uma série de substâncias antioxidantes, é retirado como parte rotineira da metodologia de criopreservação [1].

Curcumina, um fitoquímico natural derivado da cúrcuma (*Curcuma longa*), possui múltiplas ações biológicas: é um anticarcinogênico, antioxidante, reno-protetor, cardioprotetor e neuroprotetor. A modulação de vias de sinalização celular através da curcumina é vista atualmente como um potencial terapêutico para muitas doenças. A curcumina exerce efeitos de remoção de ROS, além de favorecer o aumento da concentração de glutatona intracelular, protegendo lipídios da peroxidação [2].

A curcumina vem sendo empregada na criopreservação de sêmen de suínos, bovinos, ratos e humanos [2] [3] [4] [5]. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de cúrcuma na qualidade de sêmen equino criopreservado.

Material e Métodos - Foram utilizadas duas amostras seminais, uma de cada garanhão para avaliar a reprodutibilidade do estudo. A coleta foi realizada utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C. Os ejaculados apresentaram valores superiores a 70% para a motilidade e escore 3 de vigor, atendendo aos parâmetros preconizados para congelamento do sêmen equino [5].

Para o processo de congelamento, o ejaculado foi diluído na proporção de 1:1 (sêmen:diluidor) com diluidor de refrigeração Botusêmen® (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), e centrifugado a 600g por 10 minutos (centrífuga Fanem Baby, Guarulhos, São Paulo, Brasil). O sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspendidos com o diluente de congelamento Botucurio® (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), ao qual foram acrescentadas as diferentes concentrações de curcumina.

As concentrações de curcumina foram preparadas utilizando o antioxidante Curcumin (C1386 Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluído em DMSO e apresentando as concentrações finais de 0,5mM, 1,5 mM e 3mM.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL em uma concentração de 100×10^6 spz/ palheta. Quatro palhetas foram envasadas por garanhão, uma para cada concentração de cúrcuma e um controle. Após o envase, ocorreu o período de estabilização, sendo mantidas a 5°C por 20 minutos. A seguir, as palhetas foram dispostas em uma bandeja e transferidas para um Isopor térmico contendo nitrogênio líquido e mantidas no vapor de nitrogênio por 20 minutos, a 6 cm acima do nível do nitrogênio líquido. Após este período as palhetas ficaram imersas no nitrogênio líquido e, então, armazenadas em raques e estocadas em botijão de Nitrogênio a -196°C.

O sêmen foi descongelado a 37°C por 30 segundos e mantido na mesma temperatura. Para analisar a motilidade progressiva e total, utilizou-se o software Sperm Class Analyzer (SCA@, versão 5.3). Diluiu-se 10 µl de sêmen em 20 µL de TALP, uma alíquota de 10 µL foi alocada na Câmara de Makler aquecida a uma temperatura de 37°C e analisados sob objetiva de 10x, PH -. Para cada amostra, foram analisados cinco campos.

Para avaliar a viabilidade celular, integridade de membrana e função mitocondrial corou-se a amostra descongelada com sondas fluorescentes e analisou-se em citômetro de fluxo (CytoFLEX, Beckman-Coulter, FL, USA). Foram adicionados 20 µl de sêmen descongelado a 180 µL de TALP a 37°C, obtendo a concentração final de 5×10^6 spz/ml. Então, adicionou-se as sondas fluorescentes: Iodeto de Propídio, HOESCHT 33342 e Mitostatus Red e incubou-se a 37°C por 20 min. Após a incubação, adicionou-se 800 µL de TALP aquecido e procedeu-se a leitura no Citômetro de fluxo. A análise estática utilizada foi o teste exato de Fisher, com $p < 0,05$ de significância.

Resultados e Discussão - As três concentrações de curcumina propostas, produziram um efeito estatisticamente significativo negativo ($p < 0,05$) sob os parâmetros de qualidade seminal analisados, quando comparadas ao controle. Quando comparadas entre as diferentes concentrações, a dose de 0,5mM obteve resposta significativa, na motilidade total e progressiva, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da comparação entre concentrações de cúrcuma e parâmetros de qualidade seminal.

| Concentração de cúrcuma (mM) | Motilidade total (%) | Motilidade progressiva (%) | Integridade de membrana plasmática (%) | Alto potencial mitocondrial (%) |
|------------------------------|----------------------|----------------------------|--|---------------------------------|
| Controle | 57 ± 21,21 | 37,5 ± 9,19 | 40,5 ± 0,7 | 20,5 ± 21,5 |
| 0,5 | 21 ± 9,89* | 14,5 ± 7,7* | 0,0* | 0,0* |
| 1,5 | 0* | 0* | 0,0* | 0,0* |
| 3 | 0* | 0* | 0,0* | 0,0* |

Este resultado negativo também foi obtido em análise de sêmen de rato, cuja motilidade e a viabilidade espermática in vitro foram prejudicadas em presença da cúrcuma [4]. Em contrapartida, 0,5 mM de cúrcuma proporcionou um efeito protetor na integridade funcional da membrana ($54,40 \pm 2,09$ e $50,00 \pm 2,68$) em comparação com o controle ($37,20 \pm 1,77$, $p < 0,001$) na congelação de sêmen bovino [3]. Outro trabalho indicou que a adição de 0,25 ou 0,50 mmol/L de curcumina resultou em maior porcentagem de motilidade progressiva (33,3 e 36,0 respectivamente) ($p < 0,001$) em suínos [2]. Resultados positivos também foram encontrados em pacientes humanos portadores de leucocitospermia [5].

Considerações Finais - Baseado nos resultados obtidos conclui-se que as concentrações de 0,5 mM, 1,5mM e 3mM de cúrcuma não são adequadas para a criopreservação de sêmen equino. Novos estudos devem ser realizados para testar menores concentrações desta substância antioxidante nos protocolos de resfriamento e de congelação do sêmen equino, já que resultados positivos foram observados em outras espécies, mostrando como a cúrcuma pode ser promissora para a criopreservação.

Referências Bibliográficas

- [1] MORAES, E. A. et al. Cholesterol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 158, p. 19-24, 2015.
- [2] CHANAPIWAT, Panida; KAEOKET, Kampon. The effect of Curcuma longa extracted (curcumin) on the quality of cryopreserved boar semen. *Animal Science Journal*, v. 86, n. 9, p. 863-868, 2015. [3] BUCAK, M. N. et al. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. **Andrologia**, v. 44, n. s1, p. 102-109, 2012.
- [4] GLOMBIK, K.; BASTA-KAIM, A.; SIKORA-POLACZEK, M.; KUBERA, M.; STAROWICZ, G.; STYRNA, J.; **Curcumin influences semen quality parameters and 4 reverses the di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)-induced 5 testicular damage in mice**. PHAREP 119 1-6.
- [5] ZHANG, L. *et al.* *In vitro* antioxidant effect of curcumin on human sperm quality in leucocytospermia. **Andrologia**, v. 49, n. 10, 2017.
- [6] COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal** (CBRA). 3th ed. Belo Horizonte; 2013.

Relação custo benefício do exame andrológico de touros

Eliane Vianna da Costa e Silva¹

Grupo de Estudos e Pesquisas em Reprodução Animal
de Mato Grosso do Sul, GERA-MS/CNPq

Abstract: This work intends to show the viability of the andrological exam by means of a simulation of costs and benefits in future fertility. In an Excel program, the veterinarian can modify the specific fields you typed by entering new values and updating them. Considering the management strategies of traditional bulls and the prospects of establishing new proportions bull:cow, improving fertility. The simulation allows the interested technician to easily calculate the aggregate benefits. The adoption of the Andrological Clinical examination allows the improvement of the bovine fertility and presents a cost ratio: positive benefit and can aggregate the revenue of the farm between 4.39 and up to 24,35% depending on the decision making and the benefits achieved.

Keywords: bulls; beef cattle; breeding soundness evaluation; economic costs.

Palavras-chave: custos econômicos; exame andrológico; gado de corte; touros.

Introdução - Os benefícios do exame andrológico são muitos do ponto de vista de ganhos em fertilidade no rebanho, além do controle de alterações patológicas herdáveis. No entanto, para muitos técnicos é difícil convencer proprietários a bancar os custos do exame andrológico, por não enxergarem a relação custo benefício positiva imediata.

Este trabalho pretende mostrar a viabilidade do exame andrológico por meio de uma simulação de custos e benefícios na fertilidade futura.

Materiais e Métodos - Numa planilha Excell foi simulado o custo médio de avaliação andrológica de um rebanho, em 80% da arroba por touro. A arroba foi estimada no valor de R\$ 104,00, valor atualizado em 03/05/2018. O valor da arroba foi obtido por meio de consulta no sita da Scott consultoria [2], bem como o valor de bezerros desmamados de 175 kg estimado em R\$ 940,00 (novecentos e quarenta reais), o que leva ao cálculo do kg de carne de bezerro produzido de R\$ 5,37, preço médio de touros comerciais de R\$ 6.000,00 e touros avaliados geneticamente no valor médio de leilão de R\$ 10.000,00. Utilizou-se para simulação um rebanho de 1000 fêmeas, considerando a atividade de 40 touros manejados em monta natural na relação touro:vaca (PTV) tradicional de 1:25. Com taxa inicial de gestação de 75% e taxa de desmama de 70%. Após o exame andrológico, considerou-se 25% de descarte dos animais no primeiro ano e 20% nos anos seguintes.

¹ Docente, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, e-mail: eliane.silva@ufms.br

Numa planilha Excel o veterinário poderá modificar os campos específicos digitados, inserindo novos valores e atualizá-los.

Resultados e Discussão - Partindo-se do primeiro ano, sem a avaliação de exame andrológico estima-se que a propriedade realizará um descarte médio de 20%. Desta feita haverá uma arrecadação pelo abate dos touros de R\$ 26.000,00. Considerando a taxa de desmama de 70%, a arrecadação com a venda dos bezerros foi estimada em R\$ 32.9000,00 para os machos e R\$ 31.9000,00 para as fêmeas, valor total de R\$ 614.600,00. Apesar das fêmeas não serem vendidas, serão incorporadas ao rebanho de recria para reposição, devendo ser considerado como capital investido na nova fase.

No segundo ano, considerando a primeira reposição de touros tradicional a fazenda inicia os exames andrológicos ao custo 80% do valor da arroba por touro, alcançando o valor total de R\$ 4.160,00 e potencialmente agrega nesta primeira estação com touros avaliados uma taxa de desmama de 80%. Além de, na reposição dos touros por novos machos avaliados, poder agregar ganho de peso na progênie, o que repercutirá no terceiro ano. O fato de trabalhar com touros avaliados permite que se diminua a proporção touro:vaca para 3% [3], mas ainda que considerando que não se altere a PTV mantendo-a a 4%, haverá a arrecadação de venda dos touros descartados para abate (R\$ 26.000,00) e os custos de reposição com a compra de novos animais (R\$ 48.000,00). A arrecadação com a melhoria dos bezerros passa a R\$ 376.000,00 com os machos e R\$ 365.257,14 de capital empatado na incorporação das fêmeas à recria. Considerada receita de abate de touros e o gasto com reposição dos touros a receita final foi estimada em R\$ 741.257,14, perfazendo um valor superior ao ano anterior em 14,05%.

No ano 3, o produtor poderá incorporar mais ganhos como diminuir a PTV na propriedade para 2%, algo perfeitamente possível para quem trabalha com touros zebrúinos [4] além de agregar na compra de touros de melhor potencial genético com DEP para peso a desmama de 15 kg por exemplo, que repercutirá na desmama no 4º ano. Mas como já houve ganhos referentes a incorporação de touros melhores no ano anterior o produtor acrescenta à receita um valor de 4,39% em relação ao segundo ano quando já realizava exame andrológico e 17,83% em relação ao período que não adotava a técnica. Obviamente que as decisões tomadas na escolha de touros melhoradores têm impacto substancial no desempenho no ano posterior.

No quarto ano, o produtor terá trocado 80% da tourada, este ganho pode ser acelerado com a adoção de descarte maior como 25%, por exemplo, e, no primeiro ano, este descarte pode até ser superior, alcançando 30% como previsto por [1]. Os benefícios de uma tourada de melhor potencial genético refletem-se na melhoria da qualidade dos bezerros, aumentando a arrecadação. No 4º ano potencialmente agrega-se 7,93% em relação ao ano 3 e 24,35% nos lucros em relação ao ano 1, quando não se realizava o exame andrológico.

Nesta simulação não agregamos fertilidade expressiva às filhas destes touros melhoradores, que podem ser mais precoces e mais férteis, dependendo das escolhas dos touros, os ganhos põem ser maiores. A planilha Excell pode ser obtida entrando em contato com o autor, pois neste caso o autor poderá substituir os valores de touro, arroba, kg de bezerro por valores regionais e fazer estimativas para sua situação de atuação profissional.

Tabela 1. Simulação de custo:benefício do exame andrológico no sistema de cria em gado de corte.

| | ANO 1 | ANO 2 | ANO 3 | ANO 4 |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Vacas | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| Proporção touro:vaca | 4% | 4% | 2% | 2% |
| n tourosTotal | 40 | 40 | 20 | 20 |
| valor do exame andrológico | 104 | 104 | 104 | 104 |
| custo exame andrológico total | R\$ - | R\$ 4.160,00 | R\$ 2.080,00 | R\$ 2.080,00 |
| % desmama | 70% | 80% | 80% | 80% |
| n bezerros produzidos (médio) | 700 | 800 | 800 | 800 |
| Peso médio dos bezerros (kg) | 175 | 175 | 180 | 195 |
| CUSTO DE REPOSIÇÃO DO TOURO | | | | |
| n touros comprados | 10 | 8 | 4 | 4 |
| Valor do touro | R\$ 6.000,00 | R\$ 6.000,00 | R\$ 10.000,00 | R\$ 10.000,00 |
| Valor total da compra | R\$ 60.000,00 | R\$ 48.000,00 | R\$ 40.000,00 | R\$ 40.000,00 |
| RECEITA DE BEZERROS | | | | |
| Bezerros | R\$ 329.000,00 | R\$ 376.000,00 | R\$ 386.742,86 | R\$ 418.971,43 |
| Bezerras | R\$ 319.600,00 | R\$ 365.257,14 | R\$ 376.000,00 | R\$ 408.228,57 |
| Total | R\$ 648.600,00 | R\$ 741.257,14 | R\$ 762.742,86 | R\$ 827.200,00 |
| RECEITA DE ABATE touros | R\$ 26.000,00 | R\$ 26.000,00 | R\$ 27.300,00 | R\$ 27.300,00 |
| RECEITA DO TOURO - CUSTO - ABATE | R\$ (34.000,00) | R\$ (26.160,00) | R\$ (14.780,00) | R\$ (14.780,00) |
| RECEITA | R\$ 614.600,00 | R\$ 715.097,14 | R\$ 747.962,86 | R\$ 812.420,00 |
| CUSTO: BENEFÍCIO (%) | | | | |
| em relação ao ano anterior | | 14,05 | 4,39 | 7,93 |
| Entre o ano avaliado e o ano 1 | | | 17,83 | 24,35 |

Preços regionais praticados do Bezerro desmamado (175kg) R\$ 940,00, preço por quilo do bezerro R\$ 5,37/kg, Valor da arroba local R\$ 130,00.

Considerações Finais - A adoção do exame clínico andrológico permite a melhoria das taxas de fertilidade do rebanho e apresenta uma relação custo:benefício positiva e pode agregar a receita da fazenda entre 4,93 e até 24,35% ao longo o tempo e dependendo das tomadas de decisão e dos benefícios alcançados.

Referências Bibliográficas

- [1] FONSECA VO. Puberdade, adolescência e maturidade sexual: aspectos histopatológicos e comportamentais. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8, 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.7-93.
- [2] Scot Consultoria. <https://www.scotconsultoria.com.br/cotacoes/reposicao/?ref=smn> consulta em 03/05/2018.
- [3] COSTA E SILVA, E. V.; FONSECA, V. O. ; HERMANNY, A. ; RIOS, C. M. L. ; BARBEITOS JÚNIOR, R. . Avaliação andrológica de touros Nelore e aptidão reprodutiva. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 17, n.3-4, p. 97-109, 1993.
- [4] COSTA E SILVA, E.V. (1999). Comportamento, Manejo e Seleção de Touros Nelore In: Workshop de nutrição e reprodução, 1, **Palestras...** Goiânia: UFG, cd-room.

A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species

Eduardo dos Santos Rossi¹

Gabriel Augusto Novaes²

Bruno Rogério Rui²

Daniel de Souza Ramos Angrimani¹

Luana de Cássia Bicudo²

João Diego de Agostini Losano²

Marcilio Nichi²

Ricardo José Garcia Pereira²

Abstract: The aim of this study was to standardize the toluidine blue stain technique for the analysis of DNA fragmentation of bull, ram and stallion spermatozoa. For this purpose, we used six animals of each specie. Sperm was collected and samples were split into two aliquots: a sperm sample was kept at 5°C (intact sperm DNA), and the remaining samples were submitted to the induction of DNA fragmentation. Samples were then mixed to obtain known and progressive proportions of sperm with fragmented DNA (0, 25, 50, 75 and 100%). Semen smears were performed and subjected to staining with TB. We observed high linear regression coefficients between the expected proportion of damaged DNA and the results of TB for ram, bull and stallion samples. In conclusion, TB stain was considered a fast and effective technique for the study of spermatozoa DNA.

Palavras-chave: andrologia; infertilidade; reprodução assistida.

Keywords: andrology; infertility; assisted reproduction.

Introdução - A integridade do DNA espermático é um importante indicador de fertilidade em homens, portanto testes que avaliem tal integridade vêm sendo empregados na triagem para a reprodução assistida. Este cuidado pode ser justificado devido ao impacto negativo da fragmentação do DNA espermático na fertilização, no desenvolvimento embrionário e na implantação do embrião [1]. Ademais, em animais, uma elevada porcentagem de danos ao DNA ocasiona baixas taxas de prenhez e alterações na formação do feto [2]. Neste contexto, o teste de integridade do DNA deve ser utilizado como uma ferramenta útil no diagnóstico de infertilidade, sendo atualmente realizado através de *Assessment of Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)*, *sperm chromatin dispersion test*, *terminal transferase dUTP nick-end labelling (TUNEL assay)* e *alkaline comet assay* [3 e 4]. No entanto, a maioria destas técnicas são labo-

¹ Departamento de Reprodução Animal e Radiologia veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus Botucatu.

² Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

ratoriais e requerem equipamentos caros e de alta precisão, o que inviabiliza o uso em condições de campo. Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais acessíveis, sendo a coloração com Azul de Toluidina (AT) uma alternativa promissora [5]. Essa técnica baseia-se na suscetibilidade do grupo fosfato livre do DNA e protaminas espermáticas em ligarem-se às moléculas do corante [6]. Isto significa dizer que quanto maior a concentração de grupos fosfato livres, mais corado (azulado) ficará o DNA da célula [7]. O AT é uma técnica rápida, pouco dispendiosa e eficiente, a qual pode ser incorporada nas análises seminais de rotina como teste de fertilidade e triagem [8]. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi padronizar a técnica de AT para a análise da fragmentação de DNA de espermatozoides de touros, carneiros e garanhões.

Material e Métodos - Para este estudo, nós utilizamos seis animais de cada espécie (touro, garanhão e carneiro; n= 18), em idade reprodutiva e com qualidade seminal comprovada. Todos os animais estavam saudáveis no momento do estudo. As coletas de sêmen foram realizadas de acordo com protocolos previamente descritos na literatura para cada espécie. O sêmen de touros foi obtido através de eletroejaculação, utilizando o dispositivo Torjet 65C® (Eletrovet) [9]. Para a obtenção do ejaculado de garanhão e carneiro utilizou-se a técnica de vagina artificial. Foram consideradas apenas amostras com motilidade espermática acima de 60% como critério de inclusão. Após a coleta, as amostras seminais foram divididas em duas alíquotas: uma foi mantida a 5°C (considerada com o DNA espermático intacto), e a restante foi submetida à indução da fragmentação do DNA através da exposição à luz ultravioleta (Fluxo Veco VLFS12M) por 4 horas a 25°C. Após este período as amostras submetidas à luz ultravioleta foram combinadas com as amostras intactas, com o objetivo de obter-se proporções conhecidas e progressivas de espermatozoides com DNA fragmentado (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Então, esfregaços de sêmen foram realizados e submetidos à técnica de coloração de AT, adaptada [8]. Os esfregaços de sêmen foram preparados usando 10 µl das misturas nas proporções de 0%, 25%, 50%, 75% e 100% (taxa de espermatozoides com DNA danificado/íntegro) e então fixados em 96% etanol-acetona por 30 minutos a 4°C. Após secar, as amostras foram hidrolisadas em 0,1 N HCL por 5 minutos a 4°C e lavadas três vezes em água destilada por 2 minutos. Posteriormente, estas foram expostas ao corante AT (0,05%) por 20 minutos e lavadas duas vezes em água destilada por 2 minutos. Por fim, os esfregaços foram avaliados em microscopia de luz (Dialux 20) no aumento de 1,000X sob óleo de imersão. As células com DNA íntegro não se apresentaram coradas, enquanto as células com fragmentação de DNA eram observadas com coloração azul na região do núcleo. Avaliou-se o mínimo de 200 células e os resultados foram expressos em porcentagem (%). A análise da integridade do DNA espermático foi realizada por apenas um analisador. Todos os dados foram avaliados utilizando o sistema *SAS System for Windows* (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A regressão linear foi realizada com a análise de dados guiados pelo SAS. Foram considerados coeficientes de regressão linear elevados entre as proporções esperadas de DNA danificado quando o nível de significância foi de 5%. Em outras palavras, diferenças estatísticas foram consideradas se $p < 0.05$.

Resultados e Discussão - Foi observado elevado coeficiente de regressão linear entre as proporções esperadas de DNA danificado em nossos resultados utilizando AT para todas as espécies estudadas (fig. 1). Os coeficientes de regressão linear foram superiores a 0,98 em todas as espécies, mostrando que a técnica de AT possui alta acurácia e repetibilidade. Em relação à avaliação dos espermatozoides de carneiros, [10] em seu estudo, descreveu que a técnica de AT para carneiros tem baixa repetibilidade, possuindo maior sensibilidade para sêmen de caprinos. No entanto, nossos dados mostraram um alto coeficiente de regressão linear para a espécie ovina. Portanto, esta diferença pode ser explicada pela nossa indução da fragmentação do DNA pela exposição à luz ultravioleta, que pode ser mais eficaz, como descrito por [11] em seus estudos com espermatozoides de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os resultados referentes às avaliações do sêmen de garanhões também apresentaram alto coeficiente de regressão linear entre as proporções esperadas de DNA danificado. De fato, a técnica de AT foi utilizada anteriormente para análise da cromatina dos espermatozoides de equinos por [7], os quais observaram um aumento significativo na fragmentação do DNA após criopreservação do sêmen. No entanto, até onde sabemos, nosso trabalho é pioneiro em padronizar a técnica de AT para a utilização em garanhões. Em touros, a coloração de AT também foi descrita para avaliação da fragmentação do DNA espermático. [12] observaram um baixo nível de espermatozoides com cromatina danificada após o processo de criopreservação. Por outro lado, [13] descreveram que espermatozoides com anormalidades de cromatina não possuem, necessariamente, alterações morfológicas. [2] demonstraram que espermatozoides com DNA danificado resultam em embriões de qualidade inferior na fertilização in vitro (FIV). Isto demonstra a importância dos nossos resultados para a padronização da AT em touros, facilitando a análise de integridade da cromatina e, com isso, otimizando o processo de seleção de reprodutores.

Conclusão - A técnica de AT foi considerada uma técnica rápida e eficaz para o estudo do DNA de espermatozoides de touros, garanhões e carneiros. Além disso, a avaliação de fragmentação de DNA pela AT pode ser incorporada às análises seminais de rotina em condições de campo e quando não há estrutura adequada para o emprego de técnicas mais sofisticadas.

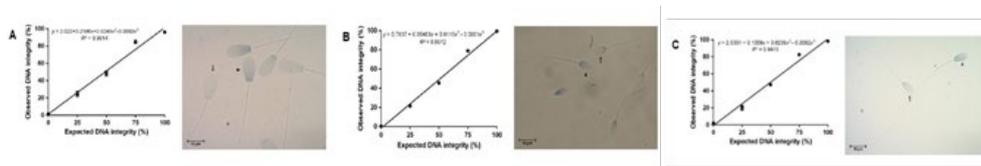


Figura 1: Análise de regressão linear e imagens de integridade do DNA de espermatozoides de touro (A), carneiro (B) e garanhão (C), avaliados pela técnica de Azul de Toluidina. Os espermatozoides com DNA fragmentado apresentam-se corados de azul (ponta de seta), enquanto os espermatozoides com DNA íntegro permanecem sem corar (seta), para todas as espécies. Aumento de 1000x.

Referências Bibliográficas

- [1] Lewis, S. E., John Aitken, R., Conner, S. J., Iulii, G. D., Evenson, D. P., Henkel, R., Gharagozloo, P. (2013). The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: Recent advances in diagnosis and treatment. **Reproductive Biomedicine Online**, 27, 325–337.
- [2] Simoes, R., Feitosa, W. B., Siqueira, A. F., Nichi, M., Paula-Lopes, F. F., Marques, M. G., Assumpcao, M. E. O. A. (2013). Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction**, 146, 433–441.
- [3] Celeghini, E. C., Arruda, R. P., Andrade, A. F., Nascimento, J., & Raphael, C. F. (2007). Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, 42, 479–488.
- [4] Zini, A., & Sigman, M. (2009). Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. **Journal of Andrology**, 30, 219–229.
- [5] Rui, B. R., Shibuya, F. Y., Kawaoku, A. J. T., Losano, J. D. A., Angrimani, D. S. R., Dalmazzo, A., Pereira, R. J. G. (2017). Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. **Theriogenology**, 90, 11–19.
- [6] Shamsi, M. B., Imam, S. N., & Dada, R. (2011). Sperm DNA integrity assays: Diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 28, 1073–1085.
- [7] Florez-Rodriguez, S. A., Arruda, R. P., Alves, M. B. R., Affonso, F. J., Carvalho, H. F., Lemes, K. M., Celeghini, E. C. C. (2014). Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. **Journal of Equine Veterinary Science**, 34, 911–917.
- [8] Erenpreisa, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., Pjanova, D. (2003). Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. **Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, 52, 19–27.
- [9] Platz, Jr C. C. , & Seager, S. W. (1978). Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 173, 1353–1355.
- [10] Kamimura, C. D., Jacomini, J. O., & Beletti, M. E. (2010). Chromatin alterations in ram and goat spermatozoa evaluated by toluidine blue and acridine orange. **Ciencia e Agrotecnologia**, 34, 212–219.
- [11] Dietrich, G. J., Szyrka, A., Wojtczak, M., Dobosz, S., Goryczko, K., Zakowski, L., & Ciereszko, A. (2005). Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. **Theriogenology**, 64, 1809–1822.
- [12] Nava-Trujillo, H., Quintero-Moreno, A., Finol, G., Rubio, J., & Hidalgo, M. (2009). Sperm chromatin fragmentation in cryopreserved semen of Brahman bulls measured with toluidine blue stain. **Reproduction in Domestic Animals**, 44, 88–88.
- [13] Beletti, M. E., Costa, L. F., & Guardieiro, M. M. (2005). Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, 22, 85–90.