

FERNANDA NOBRE BANDEIRA MONTEIRO

**BOAS PRÁTICAS APLICADAS À COLHEITA DO SEMEN BOVINO INFLUENCIAM
NOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

FERNANDA NOBRE BANDEIRA MONTEIRO

**BOAS PRÁTICAS APLICADAS À COLHEITA DO SEMEN BOVINO INFLUENCIAM
NOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Área de concentração:

Orientador: Prof. Dr. Rogério Giuffrida

Presidente Prudente - SP
2021

636.23 M775b	<p>Monteiro, Fernanda Nobre Bandeira. Boas práticas aplicadas à colheita do sêmen bovino influenciam nos parâmetros espermáticos / Fernanda Nobre Bandeira Monteiro. – Presidente Prudente, 2021. 54f.: il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021. Bibliografia. Orientador: Rogério Giuffrida</p> <p>1. Sêmen. 2. Bovinos. 3. Microbiologia I. Título.</p>
-----------------	---

Catalogação na Fonte: Michele Mologni – CRB 8-6204

FERNANDA NOBRE BANDEIRA MONTEIRO

**BOAS PRÁTICAS APLICADAS À COLHEITA DO SEMEN BOVINO INFLUENCIAM
NOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Fisiopatologia Animal.

Presidente Prudente, 12 de março de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa Dr. Inês Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Profa. Dr. Amanda Keller Siqueira
Universidade Estadual do Centro Oeste– Unicentro
Garapuava-PR

DEDICATÓRIA

“Ao meu marido Lucas que foi capaz de suportar todos os meus momentos de estresse durante o processo. À minha filha, Lara, pela sua compreensão com as minhas horas de ausência. Com muita gratidão no coração por fazer parte da minha vida. Gratidão infinita.”

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelas infinitas proteções e a pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigado por tudo. Ainda não descobri o que eu fiz para merecer tanto.

Ao **Prof. Rogério**, pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação. Tantas vezes que nos reunimos e, embora em algumas eu chegassem desestimulada, bastavam alguns minutos de conversa e umas poucas palavras de incentivo e lá estava eu, com o mesmo ânimo do primeiro dia de aula. Obrigado por acreditar em mim e pelos tantos elogios e incentivos. Tenho certeza que não chegaria neste ponto sem o seu apoio. Você foi e está sendo muito mais que orientador: para mim será sempre mestre e amigo.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Caliê Castilho e Profa. Dra. Inês Cristina Giometti, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Aos amigos **Sidenir Aparecida Braz Cortez e Tamiris Muniz dos Santos**, pela preocupação e apoio constantes, que tiveram que trabalhar em dobro para que eu pudesse chegar até aqui.

À empresa **TAIRANA Central de Inseminação Artificial** por ceder espaço e o incentivo a pesquisa.

Aos amigos e parceiros da **Tatiana Issa Uherara Berton, Maurício de Faria Silva, Renan Yudi Shintate** pelo carinho e imensa ajuda para a realização desse projeto.

À minha família por apoiarem e compreenderem o meu isolamento em inúmeras tardes de domingo.

À minha **mãe** e ao meu **pai** deixo um agradecimento especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação, abnegação, compreensão e perdão que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais. E à minha **irmã** querida, sempre pronta a me

apoiar em tudo nesta vida e principalmente por cuidar para mim do meu bem mais precioso, minha filha.

Ao meu esposo **Lucas**, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Obrigado por permanecer ao meu lado, mesmo sem os carinhos rotineiros, sem a atenção devida e depois de tantos momentos de lazer perdidos. Obrigado pelo presente de cada dia, pelo seu sorriso e por saber me fazer feliz.

À minha princesa **Lara**, por todo amor incondicional que você sempre me deu. A sua existência é o reflexo mais perfeito da existência de Deus.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001”.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Boas práticas aplicadas à colheita do semen bovino influenciam nos parâmetros espermáticos

Um dos fatores limitantes para a qualidade do sêmen bovino é a contaminação bacteriana, que normalmente é controlada com adição de suplementos antibióticos nos diluentes. O presente trabalho avaliou a influência da carga microbiana do sêmen sobre parâmetros de qualidade no espermograma. Quatro partidas de sêmen fresco de 25 touros, doadas por uma central de inseminação artificial foram diluídas e semeadas superficialmente em placas de agar Sangue ovino desfibrinado a 5%, agar Baird-Parker e agar MacConkey. Paralelamente, os equipamentos de coleta e congelamento de sêmen foram testados para contaminação microbiológica. O escore de produção de urease em caldo uréia, fermentação da frutose em caldo vermelho fenol foram avaliados para os microrganismos isolados. Contagens bacterianas foram estatisticamente correlacionadas ($p<0,05$) com percentual de defeitos totais maiores ($r=0,199$) e menores ($r=0,202$), cauda dobrada ou enrolada ($r=0,237$), cabeça isolada normal ($r=0,226$), vezes em que vagina artificial foi reutilizada ($r=0,224$), tempo para realizar a monta ($r=0,247$) e horário da coleta de sêmen ($r=0,202$). Os escores de produção de urease por *Staphylococcus* coagulase-positivo se correlacionaram com percentual de defeitos na peça intermediária e motilidade no teste de termoresistência, e de fructase com percentual de defeitos menores. Detectou-se potencial contaminação cruzada do sêmen com escovas de higiene, diluente de sêmen e circuitos de congelamento de sêmen pré-envase, que foram devidamente controlados com medidas de higiene. Os resultados indicam que concentração de bactérias no sêmen e a produção destas enzimas podem influenciar na qualidade dos espermatozoides e que o monitoramento microbiológico de equipamentos e materiais deve ser rotineiramente realizado.

Palavras-chave: sêmen, bovinos, microbiologia.

ABSTRACT

Good practices applied to the collection of bovine semen influence in the sperm parameters

One of the limiting factors for the quality of bovine semen is bacterial contamination, which is usually controlled by adding antibiotic supplements to the diluents. The present work evaluated the influence of semen microbial load on quality parameters in the spermogram. Four sets of fresh semen from 25 bulls, donated by an artificial insemination plant, were diluted and plated superficially on 5% defibrinated sheep blood agar, Baird-Parker agar and MacConkey agar. At the same time, the freezing equipment was tested for microbiological contamination. The urease production score in urea broth, fructose fermentation in phenol red broth were evaluated for the isolated microorganisms. Bacterial counts were statistically correlated ($p < 0.05$) with the percentage of major ($r = 0.199$) and minor ($r = 0.202$) total defects, folded or curled tail ($r = 0.237$), normal isolated head ($r = 0.226$), times when the artificial vagina was reused ($r = 0.224$), time to perform the breeding ($r = 0.247$) and the hour of semen collection ($r = 0.202$). Scores of urease production by *Staphylococcus* was correlated with the percentage of defects in the intermediate part and motility in the thermostability test, and fructase with the percentage of minor defects. Possible cross contamination of the semen was detected with hygiene brushes, semen diluent and semen freezing circuits pre-filling, which were properly controlled with hygiene measures. The results indicate that the concentration of bacteria in the semen and the production of these enzymes can influence the quality of sperm and that the microbiological monitoring of equipment and materials should be performed routinely.

Key-Words: microbiota, males, microbiology.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	11
2	NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA THERIOGENOLOGY...	34

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser enviado para a revista “THERIOGENOLOGY”

BOAS PRÁTICAS APLICADAS À COLETA DO SEMEN BOVINO INFLUENCIAM NOS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS

Fernanda Nobre Bandeira Monteiro¹

Ricardo Tomiyoshi Koyama²

Matheus Ramos Frassato²

Rogerio Giuffrida³

1 – Mestranda do Programa de Pós-graduação da Universidade do Oeste Pauista -Unoeste

2 – Graduando do Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Pauista -Unoeste

3 – Professor do Programa de Pós-graduação da Universidade do Oeste Pauista -Unoeste

Resumo

Um dos fatores limitantes para a qualidade do sêmen bovino é a contaminação bacteriana, que normalmente é controlada com adição de suplementos antibióticos nos diluentes. O presente trabalho avaliou a influência da carga microbiana do sêmen sobre parâmetros de qualidade no espermograma. Quatro partidas de sêmen fresco de 25 touros, doadas por uma central de inseminação artificial foram diluídas e semeadas superficialmente em placas de agar Sangue ovino desfibrinado a 5%, agar Baird-Parker e agar MacConkey. Paralelamente, os equipamentos de coleta e congelação de sêmen foram testados para contaminação microbiológica. O escore de produção de urease em caldo uréia, fermentação da frutose em caldo vermelho fenol foram avaliados para os microrganismos isolados. Contagens bacterianas foram estatisticamente correlacionadas ($p<0,05$) às características do sêmen bovino, incluindo percentual de defeitos totais maiores ($r=0,199$) e menores ($r=0,202$),

cauda dobrada ou enrolada ($r=0,237$), cabeça isolada normal ($r=0,226$), vezes em que vagina artificial foi reutilizada ($r=0,224$), tempo para realizar a monta ($r=0,247$) e horário da coleta de sêmen ($r=0,202$). Os escores de produção de urease por *Staphylococcus* coagulase-positivo se correlacionaram com percentual de defeitos na peça intermediária e motilidade no teste de termoresistência, e de fructase com percentual de defeitos menores. Detectou-se possível contaminação cruzada do sêmen com escovas de higiene, diluente de sêmen e circuitos de congelamento de sêmen pré-envase, que foram devidamente controlados com medidas de higiene. Os resultados indicam que concentração de bactérias no sêmen e a produção destas enzimas podem influenciar na qualidade dos espermatozoides e que o monitoramento microbiológico de equipamentos e materiais deve ser rotineiramente realizado.

Palavras-chave: microbiota, machos, microbiologia

1. Introdução

No Brasil, o agronegócio destaca-se como o setor com maior impulso para a economia nacional. Entre os anos de 2017 e 2018, a agropecuária contribuiu com 21,4% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional, sendo que, apenas a pecuária, representou 8,7% desse total [1,2]. Neste contexto, têm se destacado a bovinocultura brasileira, visto que o país detém o maior rebanho comercial do mundo, estimado em 215 milhões de cabeças de gado [3]. Destes, mais de quatro milhões de bovinos são machos acima de 3 anos de idade [4].

Um dos fatores determinantes para alcançar este patamar é o uso de biotecnologias da reprodução, com destaque para a inseminação artificial (IA), técnica que evoluiu nos últimos anos com a incorporação de diluentes criopreservantes, eletroejaculadores, testes de progénie e citometria de fluxo de espermatozoides portadores de cromossomos X e Y para produção de sêmen sexado [5,6]. Na última década, a tecnologia reprodutiva introduziu a edição de genoma, com mudanças rápidas nas perspectivas de avanços para a pecuária mundial [7].

Se estimulados adequadamente, touros maduros e saudáveis podem produzir de quatro a seis ejaculados por semana [8], sendo capazes de gerar centenas de partidas de sêmen congelado por ano para criar populações de

bovinos geneticamente superiores [9]. Diante da alta demanda por sêmen de qualidade superior, as centrais de IA se modernizaram incorporando tecnologias que incluem análises de imagens digitais do ejaculado e envase automatizado de sêmen diluído, a fim de maximizar a produção [10], associadas à esquemas de manejo eficientes que exploram o potencial reprodutivo de cada touro e reduzem os custos de produção associados [8].

Apesar de adotaram processos altamente tecnológicos, a qualidade do sêmen pode ser comprometida pela presença de bactérias que produzem metabólitos e produtos tóxicos capazes de prejudicar a qualidade espermática [11–13]. A maior parte destes microrganismos são oriundos da microbiota comensal do prepúcio e mucosas ou de infecções localizadas no sistema urogenital dos touros [14,15]. Mais raramente, as bactérias podem colonizar o aparelho reprodutivo a partir da via hematógena, incluindo patógenos zoonóticos altamente contagiosos como *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* [16].

Dentre as espécies e gêneros mais comuns no sêmen, podem ser isolados *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus intermedius* (ABRO, 2016; YÁNIZ et al., 2010). Amostras de sêmen bubalino fresco apresentam perfil similar, com isolamento de microrganismos como *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus auricularis*, *Moraxella bovis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans* e *Enterobacter* sp. [20].

A interação entre as enzimas produzidas pelas bactérias da microbiota genital dos touros e qualidade espermática é pouco explorada em estudos científicos [12]. Dentre as enzimas que possuem potencial para afetar a qualidade do semen, destaca-se a fructase e a urease. A fructase é uma enzima produzida por muitas espécies bacterianas que tem como alvo a metabolização do monossacarídeo frutose [21], sendo este açúcar, a principal fonte de energia para a motilidade espermática [22]. A urease é outra enzima produzida por muitas bactérias e associada à hidrólise da uréia e alguns aminoácidos, gerando a amônia, composto alcalino que podem afetar diversas funções celulares [23].

Além das bactérias oriundas do próprio touro, o sêmen pode ocorrer contaminação cruzada do sêmen com equipamentos e materiais utilizados na

coleta [24]. A persistência dos microrganismos nestes materiais é desconhecida, mas possivelmente pode ser influenciada pela formação de biofilmes em diversos materiais [25]. Diante desse cenário, programas de monitoramento de pontos de contaminação microbiológica do sêmen durante as etapas de processamento podem ser úteis para implementar programas de boas práticas nos procedimentos de coleta e congelamento de sêmen [26]. O presente estudo teve como objetivo, avaliar a influência da carga microbiana do sêmen sobre parâmetros de qualidade no espermograma.

2. Material e métodos

Foram utilizados na presente pesquisa 25 touros em idade reprodutiva, sexualmente maduros, e sem predileção por raça mantidos em regime de confinamento em uma Central de IA localizada na região Oeste do Estado de São Paulo. Foram incluídos na pesquisa, animais taurinos e zebuínos das raças Aberdeen Angus ($n=7$), Braford ($n=1$), Brangus ($n=2$), Gir ($n=1$), Girolando ($n=1$), Jersey ($n=3$), Nelore ($n=8$), Sind ($n=1$) e Tabapuã ($n=1$). Não foram utilizados critérios para inclusão destas raças na pesquisa, sendo coletadas amostras de todos os animais da Central de IA que foram manejados no período do estudo.

De cada touro, foram coletadas quatro partidas de sêmen intervaladas de quatro dias, totalizando 100 amostras avaliadas. As coletas foram baseadas nas recomendações do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [27]. No período da manhã, após higienização e lavagem da região prepucial com solução antisséptica em tronco de contenção, os animais foram encaminhados para um pátio, onde montaram sobre manequins vivos. Na primeira monta de cada touro, o pênis foi desviado da vagina artificial, realizando-se a oclusão manual da uretra, a fim de concentrar o ejaculado. A partir da segunda monta, o pênis foi desviado para dentro de vaginas artificiais lubrificadas e aquecidas, que foram encaminhadas para o setor de análises (área limpa).

Na área limpa, uma alíquota foi submetida à exames laboratoriais para determinar concentração, motilidade, vigor e percentual de defeitos maiores e menores, além de estimativa do escore de termorresistência. Após estes procedimentos, o sêmen foi diluído e envasado em paletas com auxílio de uma

plataforma automatizada em câmara fria, e depois congelado para estocagem em raques submersos em nitrogênio líquido.

Os exames microbiológicos foram divididos em duas modalidades: exames quantitativos realizados a partir de sêmen fresco, imediatamente antes de ingressar na área limpa da Central, e culturas qualitativas dos materiais e equipamentos utilizados nos procedimentos de análise, diluição e congelamento do sêmen. Nos exames do sêmen, 1 ml de ejaculado foi aspirado do interior dos cones plásticos acoplados nas vaginas artificiais com auxílio de micropipeta e ponteiras estéreis com filtro, e depositado em tubo contendo 9 mL de solução salina a 0,9% estéril (diluição 10^{-1}). O material diluído foi refrigerado em caixas isotérmicas e encaminhado para o laboratório de análises microbiológicas no menor tempo possível. Sequencialmente, foram realizadas diluições seriadas nas proporções de 10^{-2} e 10^{-3} em solução salina estéril a 0,9%. De cada diluição foram retirados 0,1 mL para semeadura superficial em triplicata em placas de agar Sangue ovino desfibrinado a 5% para isolamento de mesófilos totais, agar Baird-Parker suplementado com gema de ovo de telurito de potássio (HimediaTM) para isolamento de *Staphylococcus* spp, agar MacConkey (HimediaTM) para isolamento de enterobactérias e agar cromogênico *E. coli* para isolamento de *E. coli* (HimediaTM).

O sêmen diluído foi espalhado na superfície de cada agar com auxílio de uma alça de Drigalsky. Após 24-48 de incubação, as colônias presentes nas placas foram identificadas por características morfológicas nos meios de cultura, tintoriais (coloração de Gram) e bioquímicas [28]. As colônias foram enumeradas em contador de colônias eletrônico (Phoenix Luferco cp 600 plusTM) e os valores obtidos expressos como Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por ml de sêmen [29], separadamente para cada modalidade de microrganismos pesquisados (mesófilos totais, Enterobactérias, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positivo e coagulase-negativo).

Na segunda etapa, foram rastreados possíveis pontos de contaminação cruzada do sêmen com equipamentos e materiais utilizados em todos os processos de análise, diluição e congelamento do sêmen. Quando mais de 50% dos touros já haviam sido submetidos a coleta e análise do sêmen, foram Tritados suaves estéreis na superfície das escovas utilizadas para higienizar os

cones de coleta e vaginas artificiais, luvas utilizadas pelos colaboradores para direcionar o pênis dos touros para as vaginas artificiais, espátula e lubrificante utilizados na porção inicial das vaginas artificiais, superfície interna das vaginas artificiais e dos cones de coleta, ponteiras utilizadas para pipetagem do sêmen, frascos de vidro do tipo Ellenmeyer utilizados preparo de diluente, paletas para envase do sêmen diluído, cone para depósito de sêmen diluído dentro da câmara fria e, porção interna dos circuitos de mangueiras de silicone utilizadas para injetar o sêmen resfriado dentro das paletas. Além dos suabes, foram coletadas com micropipetas estéreis amostras de 5 ml do diluente comercial do sêmen em uso no dia. O ar resfriado que circula dentro da câmara fria foi avaliado com uso de duas placas de Petri contendo agar sangue dispostas em pontos equidistantes na plataforma de congelamento por 60 minutos [30].

Todos os materiais coletados foram refrigerados e encaminhados para as análises microbiológicas no menor tempo possível. Os suabes e a amostra de diluente foram semeados placas de agar sangue ovino desfibrinado a 5% e agar Mac Conkey, que foram incubadas, conjuntamente com as placas expostas ao ar da câmara fria, a 37°C por 24-72 horas. Após este período, as colônias isoladas mais com aparência clássica foram identificadas pelo perfil bioquímico, com chaves taxonômicas baseadas em métodos probabilísticos [28].

Após os procedimentos acima identificarem possíveis fontes de contaminação para o sêmen, foram propostas medidas de controle dos pontos de contaminação. Após 27 dias da implementação das medidas de controle, a contaminação dos mesmos pontos foi reavaliada, utilizando-se os mesmos procedimentos e pontos de coleta acima descritos.

Os isolados identificados como enterobactérias e *Staphylococcus* spp, nos meios supracitados, foram submetidos a ensaios para estimar-se a intensidade com que produziam as enzimas urease e fructase. Foram preparados inóculos contendo $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL a partir de culturas puras desenvolvidas em caldo cérebro coração, após 18 horas de incubação à 37°C. De cada inóculo foram retirados 100 µL para semeadura em 0,5 mL de caldo ureia (Himedia™) e 0,5 mL de caldo vermelho fenol contendo 1% de Frutose. Os caldos foram incubados a 37°C e examinados a cada 6 horas por 72 horas para verificação da alteração de cor. Foram consideradas urease positivas

as cepas bacterianas que modificarem a cor do caldo ureia para qualquer tonalidade de rosa [31] e para as que degradam a frutose, tonalidades de amarelo no caldo vermelho fenol [28]. As cepas foram classificadas em escores, de acordo com o tempo necessário para viragem da cor do meio: 0 = sem alteração; 1- 54 a 72 horas; 2- 36 a 48 horas; 3- 24 a 48 horas; 4 – 6 a 12 horas. Uma cepa de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC) foi utilizada como controle positivo para ambas as reações. O tempo mínimo necessário em horas para a alteração da tonalidade de cor dos meios de cultura em relação a cepa controle foi registrado.

A central de inseminação forneceu os parâmetros analisados no espermograma e no manejo de coleta de sêmen, incluindo concentração, motilidade, vigor, aspecto e cor do ejaculado, escore de termorresistência e percentual de defeitos menores e maiores, número de vezes que a vagina artificial no qual o sêmen foi depositado foi reutilizada no mesmo dia de coleta (NV), se o touro usava ou não argola nasal para o manejo de deslocamento, tempo em minutos entre a disposição do animal na frente da vaca e a decisão do touro saltar (TM), número de montas necessárias para a coleta (NMC) e horários de coleta dividido em três momentos (1º terço = 8:00-8:30; 2º terço = 8:30-9:00 e 3º terço = após as 9:00).

Para as análises estatísticas, considerou-se que cada ejaculado foi uma unidade independente a ser analisada, totalizando 100 unidades (25 touros x 4 coletas). As contagens bacterianas totais expressas em UFC/ml de ejaculado para mesófilos aeróbios totais (MAT), enterobactérias (ENB), *Staphylococcus* coagulase-negativo (SCN), *Staphylococcus* coagulase-positivo (SCP) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA) sofreram transformação logarítmica na base 10. Para valores com contagens com valores zero, acrescentou-se o valor 1,0 para viabilizar a transformação.

Recorreu-se a análise de correlação não paramétrica de Spearman para verificar a relação entre as contagens logaritmizadas dos microrganismos, parâmetros no espermograma, escore de tempo necessário para degradação da urease e fructase *in vitro* pelos microrganismos estudados e os procedimentos de manejo listados citados anteriormente. As contagens logaritmizadas foram comparadas entre touros com predominância da raça zebuína (*Bos indicus*) ou

taurina (*Bos taurus*), touros que usaram ou não argola nasal no manejo de contenção, sêmen aprovados ou não para comercialização, critérios de classificação visual do sêmen (aquoso ou concentrado) e entre ejaculados com presença ou não de *Staphylococcus* produtores biofilmes por análise de variância de modelos mistos, visando incorporar efeitos fixos e aleatórios das variáveis dependentes (repetições para mesmo touro) e independentes (touros).

3. Resultados e Discussão

Neste trabalho fomos capazes verificar que a contaminação bacteriana do sêmen está correlacionada com alterações na qualidade dos espermatozoides e que contaminações cruzadas do sêmen com equipamentos e materiais podem ocorrer nas etapas pós-colheita. Estas contaminações cruzadas podem ser minimizadas com monitoramento para aplicação de medidas de Higiene adequadas.

Das 100 amostras de sêmen analisadas, 13 (13%) estavam inaptas para comercialização, segundo critérios adotados pela empresa. As variáveis que apresentaram correlação significativa com os parâmetros do espermograma e manejo de coleta estão sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 – Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (rho) significativos ($p < 0,05$) para CBT logaritmizadas x parâmetros de manejo e resultados do espermograma.

Variáveis do espermograma	rho	p
PA x Cauda Dobrada ou Enrolada	0.237	0.020
MT x Número de espermatozoides	0.230	0.021
MT x Defeitos maiores	0.199	0.048
MT x Cabeça Isolada Normal	0.226	0.027
SCN x Defeitos menores	0.202	0.043
ENB x Cauda Dobrada ou Enrolada	0.203	0.047
<hr/>		
Variáveis do manejo da coleta		
PA x NV	0.224	0.023
SCP x TM	0.247	0.013

ENB x HC	0.202	0.044
PA = <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; NV = número de vezes que a vagina artificial foi reutilizada no touro doador do sêmen; MT = Mesófilos totais; SCN = <i>Staphylococcus coagulase-negativo</i> ; SCP = <i>Staphylococcus coagulase-positivo</i> ; TM = tempo para a monta em minutos; ENB = Enterobactérias; HC = horário da monta.		

As correlações significativas e positivas entre defeitos observados (Tabela 1) e contagem bacteriana, sugerem que a microbiota seminal exerce papel deletério na fertilidade dos touros, sendo tais ações, possivelmente concentração-dependentes, o que é condizente com pesquisas prévias [32]. As bactérias isoladas podem liberar toxinas e exotoxinas que influenciam fisiologicamente no aumento dos defeitos maiores e menores, observados no espermograma, o que pode justificar a população de mesófilos totais correlacionar-se com a presença de cauda dobrada ou enrolada. Isso pode ocorrer pela ação de toxinas bacterianas. Os mecanismos associados a este fenômeno podem estar relacionados à alteração do pH, competição por substratos [12] ou pela ação direta sobre as células, levando a defeitos estruturais na membrana dos espermatozoides [12,32,33]. Muitos destes defeitos são genéticos ou de ordem fisiológica após exposição a condições ambientais adversas [34]. No caso dos microrganismos Gram-negativos, a ação deletéria pode ser decorrente da ação de endotoxinas, (lipopolissacarídeos), capazes de reduzir a viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides [35,36].

Considera-se que *Staphylococcus* também pode ter ação deletéria em razão da produção de exotoxinas, contudo nossos dados revelaram que apenas as concentrações bacterianas de cepas não produtoras de plasma coagulase foram correlacionadas com a presença de defeitos menores. Os mecanismos exatos da ação deletéria destes microrganismos sobre a presença de defeitos maiores e menores no sêmen são ainda pouco conhecidos, [33]. Em contraste, a ação de linhagens produtoras de plasma coagulase, como *S. aureus* pode levar à redução do número de espermatozoides, supressão da motilidade, alterações na morfologia e capacidade de fertilização [37].

A correlação positiva entre o número de vezes em que a vagina artificial foi reutilizada nos procedimentos sugere que a presença de *Pseudomona aerugionsa*

no sêmen pode estar relacionada com fontes exógenas, nas etapas pós-coleta, estes microrganismos são comumente produtores de biofilmes [25], e podem desta forma, colonizar as vaginas artificiais ou materiais usados na sua higienização. Esta mesma hipótese pode explicar a correlação entre contagens de enterobactérias e período de coleta, posto que sêmen coletados nos horários finais das operações de manejo foram mais propensos a contaminação (tabela 1).

A correlação entre o tempo para monta e a presença de microrganismos sugere que touros que demoram mais para realizar a monta acumulam mais microrganismos nos trajetos de eliminação do sêmen. Uma possível explicação é a ansiedade gerada por este procedimento, que pode induzir o animal a urinar, facilitando a contaminação do sêmen [38].

Mesmo sob as melhores e mais adequadas condições de colheita, o sêmen *in natura* apresenta certa contaminação microbiana, geralmente entre 150.000 e 650.000 microrganismos/mL. Até o ano de 2005, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) preconizava que a contagem bacteriana do sêmen industrializado fornecia a indicação dos procedimentos higiênicos da central produtora e não deveria ultrapassar 5×10^3 bactérias por mL de sêmen. Entretanto, a indefinição do papel de bactérias da microbiota de prepúcio e ubiquitárias sobre a capacidade fecundante do sêmen, e ainda sobre a possibilidade de causar infecção em fêmeas bovinas, alterou as recomendações atuais da OIE sobre a colheita, higiene e manipulação do sêmen *in natura* e industrializado, não sendo mais definida a quantidade limite de microrganismos por mL de sêmen aceitável para uso em inseminação artificial. Por outro lado, a contaminação bacteriana presente no sêmen rotineiramente utilizado para IA tem se mostrado limitante para o sucesso da técnica de fertilização *in vitro*, particularmente no momento do cultivo. Pequenas quantidades de agentes ubiquitários, de microbiota autóctone ou mesmo oportunistas são francamente multiplicados nas condições empregadas na FIV [39]

Os resultados das comparações entre contagens bacterianas logaritmizadas para raças, manejo de contenção, aprovação para comercialização e critérios de classificação visual do sêmen estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Médias e desvio-padrões das contagens logaritmizadas de bactérias de 100 amostras de sêmen, segundo aptidão racial, uso de argola no manejo de contenção, aspecto de ejaculado e aprovação da partida para comercialização.

Microrganismo	Predominância da raça		p
	Taurino (N=52)	Zebuíno (N=48)	
ENB	0.687 ± 1.325	0.853 ± 1.542	0.675
SCN	0.430 ± 0.671	0.290 ± 0.420	0.904
SCP	0.080 ± 0.390	0.089 ± 0.243	0.164
MT	3.535 ± 1.900	3.852 ± 1.163	0.727
PA	0.870 ± 1.750	0.718 ± 1.442	0.835
Uso de argola para manejo			
	Sim (N=18)	Não (N=82)	
ENB	0.505 ± 0.975	0.824 ± 1.508	0.573
SCN	0.735 ± 0.620	0.279 ± 0.523	< 0.001*
SCP	0.137 ± 0.584	0.073 ± 0.240	0.546
MT	4.587 ± 1.222	3.490 ± 1.599	0.012*
PA	0.267 ± 1.135	0.913 ± 1.672	0.100
Aspecto do ejaculado			
	Aquoso (N=21)	Concentrado (N=79)	
ENB	0.756 ± 1.390	0.772 ± 1.460	0.935
SCN	0.467 ± 0.685	0.302 ± 0.483	0.520
SCP	0.094 ± 0.300	0.078 ± 0.342	0.767
MT	3.710 ± 1.585	3.675 ± 1.605	0.472
PA	0.715 ± 1.500	0.842 ± 1.668	0.731
Aptos para comercialização?			
	Sim (N=87)	Não (N=13)	
ENB	0.836 ± 1.658	0.756 ± 1.401	0.945
SCN	0.504 ± 0.645	0.340 ± 0.554	0.245
SCP	0.104 ± 0.377	0.081 ± 0.320	0.828
MT	4.077 ± 1.568	3.627 ± 1.594	0.295
PA	0.597 ± 1.461	0.826 ± 1.629	0.655

PA = *Pseudomonas aeruginosa*; MT = Mesófilos totais; SCN = *Staphylococcus* coagulase-negativo; SCP = *Staphylococcus* coagulase-positivo; ENB = Enterobactérias; p = valor de p na comparação estatística pelo teste t não pareado.

Verificou-se que as contagens bacterianas não diferiram entre raças com predominância de zebuíños ou taurinos. A composição da microbiota prepucial de touros não parece ser influenciada pelo padrão racial [40]. Contudo, a higienização e lavagem das cavidades prepucial, antes da coleta se parece ser um fator determinante para reduzir a carga microbiana no sêmen [15]. Desta forma, a concentração de microrganismos no semen pode ter sido afetada pelas lavagens, mascarando o papel das raças na aferição deste parâmetro.

A concentração de diferentes microrganismos no sêmen não foi determinante para a classificação dos animais em aptos e inaptos (tabela 2). Apesar de nossos dados revelarem que a concentração de microrganismos no sêmen está correlacionada com parâmetros negativos do espermograma (Tabela 1), acreditamos que a magnitude das alterações observadas não foi suficiente para desqualificar as partidas do sêmen e que outros fatores não controlados em nosso estudo devem ter influenciado neste aspecto. O aspecto do ejaculado também não influenciou na microbiota, denotando que a composição microbiana não parece afetar este parâmetro (Anexo 1).

Touros que usaram manejo de argola apresentaram concentrações bacterianas mais elevadas no esperma do que touros que não utilizaram. Uma hipótese para explicar este fato reside no temperamento do touro. Animais submetidos ao manejo de argola nasal para condução dos trabalhos tem temperamento mais reativo do que animais que não usam. Este parâmetro parece afetar as características seminais [41], mas com nossos dados não é possível afirmar se influenciam também na microbiota.

Os resultados da análise de correlação de Spearman entre parâmetros no espermograma e escore de produção de urease e fructase, que resultaram significativos, estão descritos na tabela 3.

Tabela 3- Coeficientes de correlação não paramétrica de Spearman (rho) significativos ($p<0,05$) para Escores de produção de urease e fructase x resultados do espermograma.

Enzima	Microrganismo	parâmetro	rho	p
Urease	SCN	% Defeitos na peça intermediária	0.484	0.006
		% Defeitos na peça intermediária	0.782	0.037
	SCP	Motilidade no Teste de termoresistência	0.940	0.001
Fructase	SCP	% Defeitos menores	0.762	0.046

SCN = *Staphylococcus* coagulase-negativo; SCP = *Staphylococcus* coagulase-positivo.

Assumiu-se que na presente pesquisa, o tempo requerido para degradar a uréia (produção de urease) e a frutose (produção de fructase) são indicadores fenotípicos razoáveis da magnitude com que as cepas isoladas expressam estas enzimas. Nossos dados revelaram que cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivo e negativo, fortemente produtoras de urease, foram isoladas de amostras de esperma bovino com alta percentagem de defeitos em peças intermediárias. Esta observação é corroborada pela forte correlação positiva entre produção de urease por cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivas e redução da motilidade espermática no teste termorresistência. Estes resultados sugerem que esta enzima tem ação direta ou gera metabólitos tóxicos para que prejudicam a os fragelos dos espermatozóides. A urease é reconhecida como um fator de virulência em cepas associadas a infecções urinárias, sendo possível que tenha papel relevante na gênese de alternações espermáticas [42]. A ação foi mais intensa para as cepas coagulase-positivas, que em geral, são mais associadas à maior variedade de patologias do que as cepas coagulase-negativas [43].

A produção da fructase, ao contrário do que se esperava, não foi correlacionada com parâmetros diretamente ligados a movimentação espermática, incluindo a motilidade e o vigor [22,44]. Contudo, a enzima parece ter alguma ação sobre a presença de alterações espermáticas, visto que foi fortemente correlacionada com percentual de defeitos menores. Uma possível

explicação para este fato são alterações drásticas no pH seminal, posto que este açúcar pode gerar metabólitos ácidos, sendo comum em agentes microbianos [45].

Na tabela 4 estão descritos os pontos críticos para contaminação cruzada do sêmen, microrganismo detectado e forma de controle aplicada. Em todas as etapas, a aplicação das medidas de controle foi efetiva em reduzir e/ou erradicar a contaminação.

Tabela 4 – Pontos críticos para contaminação de equipamentos em diferentes etapas dos procedimentos de coleta e congelamento de sêmen bovino.

Etapa	Material	Microrganismo	Forma de controle
Pré-coleta	Escova de lavagem	<i>Edwardsiella tarda</i>	Lavagem das escovas com água aquecida
	Luvas dos colaboradores	<i>Micrococcus spp</i>	Não foi considerado ponto de controle
	Lubrificante e espátula para lubrificação das vaginas artificiais	Complexo <i>Enterobacter sp</i>	Desinfecção das espátulas antes do uso
	Revestimento de borracha das vaginas artificiais	Negativo	NA
	Cone coletor de sêmen acoplado na vagina artificial	Negativo	NA
Diluição do sêmen	Tampas dos fracos tipo "Falconi" onde sêmen o ejaculado é coletado	Negativo	NA
	ponteiras para pipetagem do sêmen	Negativo	NA
	frascos de vidro do tipo Ellenmeyer de preparo de diluente	Negativo	NA
Congelamento	diluente estéril	Complexo <i>Enterobacter sp</i>	Revisão da sensibilidade dos agentes aos antibióticos adicionados nos diluidores
	paletas para envase do sêmen diluído	Negativo	NA
	Ar que circula dentro da câmara fria	Fungos e bolores	Manutenção e limpeza dos filtros e sistemas de condicionador do ar
	cone para depósito de sêmen diluído	Negativo	NA
	circuitos de mangueiras de silicone do aparato de envase	<i>Serratia liquefaciens</i>	Troca periódica dos circuitos das mangueiras

NA = não se aplica

O monitoramento das etapas de contaminação mostrou-se efetivo em controlar microrganismos presentes nas etapas pós-ejaculação. Em uma segunda análise, não foram detectadas contaminações nestes equipamentos. Contudo, os resultados reforçam a preocupação com contaminações pós-processamento que podem inserir bactérias prejudiciais a qualidade espermática por meio de contaminação cruzada.

As escovas plásticas utilizadas na higienização das vaginas artificiais apresentaram contaminação, mesmo após imersas em solução de cloreto de benzalcônio, na concentração de 10mL em 20 litros de água, por 2 horas antes do uso. Estes resultados sugerem que o microrganismo isolado apresenta resistência frente ao desinfetante. Este é um fenômeno conhecido, sendo relatado para vários microrganismos, contudo outros fatores podem influenciar a ação dos desinfetantes sobre os microrganismos, incluindo diluição, tempo de ação, interação com outras substâncias, etc. [46,47]. Dentre as possíveis alternativas, podem ser recomendadas trocas periódicas de escovas, aumento na concentração do desinfetante e métodos de inativação alternativos como água aquecida. Deve-se levar em conta que concentrações altas de cloreto de benzalcônio tem efeito espermicida, limitando sua aplicabilidade nas centrais de inseminação [48].

As contaminações das espátulas usadas para aplicar lubrificante nas vaginas artificiais também estavam contaminadas. Considerando-se que são higienizadas sempre antes do uso no início do dia, os microrganismos possivelmente se acumulam na superfície a partir no início do período de coleta. A troca das espátulas foi efetiva para reduzir a contaminação.

Na área limpa da Central, onde o sêmen é analisado e diluído, o ponto de contaminação mais importante foi o diluente. Os diluentes em geral são ricos de nutrientes e crioprotetores capazes de suprir as necessidades de crescimento de muitos microrganismos. Desta forma, a adição de antimicrobianos com ação seletiva sobre células procarióticas nos diluentes é fator preponderante para manter a qualidade dos espermatozoides [18]. O isolamento de microrganismos do diluente sugere a existência de dois possíveis problemas: contaminação do diluente com microrganismos resistentes ou perda da estabilidade química do antimicrobiano. Penicilinas e aminoglicosídeos, comumente utilizados nos

diluentes, em geral perdem a estabilidade após alterações de pH e temperatura [49,50]. A presença de microrganismos resistentes em animais pecuários é um problema emergente de ordem mundial, e, de fato, espera-se que chegue as Centrais de Inseminação, assim como visto que estão amplamente disseminados nos sistema agroprodutivos [51,52]. A recomendação, contudo, foi a de monitorar a resistência dos microrganismos isolados, determinando-se a Concentração Inibitória Mínima frente aos agentes antimicrobianos presentes no diluente, para corrigir a concentração ou alterar a composição. Uma alternativa que pode ser interessante é filtragem do diluente em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro [53] antes da diluição, contudo, este processo ainda não foi validado para diluentes espermáticos.

A contaminação dos circuitos das mangueiras de silicone que injetam o sêmen diluído nas paletas é preocupante, visto que estes materiais favorecem a formação biofilmes bacterianos, mantendo a contaminação presente nos circuitos por longos períodos [54], dificultando, inclusive a ação de antimicrobianos. Tendo em vista o baixo custo do material a recomendação foi a troca destes materiais para reduzir a contaminação do sêmen.

O trabalho apresenta algumas limitações. A relação entre a concentração de microrganismos no sêmen e a fertilidade de vacas inseminadas, ou as taxas de sucessos em procedimentos com transferência e de embrião ou fertilização in vitro não puderam ser avaliados até o momento. Contudo, temos perspectivas de analisar a relação entre estes fatores em estudos futuros.

4. Conclusão

Os resultados deste estudo sugerem que as populações bacterianas presentes no sêmen bovino são moduladas por fatores fisiológicos como a microbiota natural, monta dos touros e que as contagens bacterianas do sêmen, por conseguinte, podem refletir na qualidade espermática. A intensidade com que as enzimas urease e fructase são produzidas pelas bactérias pode interferir nos parâmetros de qualidade espermática. O monitoramento da contaminação dos equipamentos de coleta e congelamento de sêmen é procedimento recomendável para garantir a qualidade sanitária do sêmen comercializado.

Agradecimentos

À Central de Inseminação artificial Tairara S/A pela doação das partidas de sêmen. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES – Código de Financiamento 001.

ANEXO 1

Características seminais desejais

Tabela 1. Características do ejaculado de touros coletados pela vagina artificial.

Características	Valores
Volume (Vagina Artificial)	5-8 mL
Cor	branca ou amarelo-marfim
Odor	"sui generis"
Movimento em massa	≥ 3
Motilidade espemática	≥ 60%
Vigor	≥ 3
Concentração espermática	~350x10 ⁶ /mL
Nº total espermatozoides / ejaculado	3-5 x 10 ⁹
Espermatozoides morfologicamente normais	≥ 70%
Defeitos maiores	≤ 10%
Defeitos menores	≤ 20%
Defeitos individuais maiores	≤ 5%
Defeitos individuais menores	≤ 10%

Colégico Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abiec. Perfil da pecuária no Brasil. Assoc Bras Das Indústrias Export Carnes Bov 2019:49.
- [2] CEPEA. CEPEA ESALQ. Planilha Do PIB Do Agronegócio Bras 1996 a 2018 2019:CEPEA.
- [3] IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal 2017. Brazilian Inst Geogr Stat 2017.
- [4] ANUALPEC. Anuário da pecuária brasileira. FNP Consul. São Paulo: FNP Consultoria/Agros Comunicação; 2018.

- [5] Morrell JM, Wallgren M. Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens* 2014;3:934–46. doi:10.3390/pathogens3040934.
- [6] Morrell JM. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Domest Anim* 2006;41:63–7. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x.
- [7] Moore SG, Hasler JF. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J Dairy Sci* 2017;100:10314–31. doi:10.3168/jds.2017-13138.
- [8] Schenk JL. Review: Principles of maximizing bull semen production at genetic centers. *Animal* 2018;12:s142–7. doi:10.1017/S1751731118000472.
- [9] Funk DA. Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *J Dairy Sci* 2006;89:1362–8. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72203-2.
- [10] Harstine BR, Utt MD, DeJarnette JM. Review: Integrating a semen quality control program and sire fertility at a large artificial insemination organization. *Animal* 2018;12:s63–74. doi:10.1017/S1751731118000319.
- [11] González-Marín C, Roy R, López-Fernández C, Diez B, Carabaño MJ, Fernández JL, et al. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Anim Reprod Sci* 2011;123:139–48. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.11.014.
- [12] Rideout MI, Burns SJ, Simpson RB. Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;32:35–40.
- [13] Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V, et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:47–56. doi:10.1007/s10815-008-9283-5.
- [14] Delcaru C, Alexandru I, Podgoreanu P, Grosu M, Stavropoulos E, Chifiriuc MC, et al. Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: Etiology, pathogenicity, and combating strategies. *Pathogens* 2016;5. doi:10.3390/pathogens5040065.
- [15] Paray A, Bhakat M, Lone S, Mohanty T, Sinha R, Ur Rahman J, et al. Role of preputial washing in reducing microbial load and improving bovine semen quality. *Asian Pacific J Reprod* 2018;7:97. doi:10.4103/2305-0500.233570.

- [16] Dehkordi FS, Khamesipour F, Momeni M. İran'da sığır ve yaban sığırları semen Örneklerinde *Brucella abortus* ve *Brucella melitensis*: Kültür, Konvansiyonel ve real-time polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak mevsimsel, Yaşa bağlı ve bölgesel dağılımı Üzerine İlk klinik Çalışma. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2014;20:821–8. doi:10.9775/kvfd.2014.10827.
- [17] Abro SH. Antibiogram of the *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus intermedius* isolated from the bovine frozen semen. *Pure Appl Biol* 2016;5:204–12. doi:10.19045/bspab.2016.50027.
- [18] Yániz JL, Marco-Aguado MA, Mateos JA, Santolaria P. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Anim Reprod Sci* 2010;122:142–9. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.006.
- [19] Melo A, Santos Júnior E, Adrião M, Wischral A. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. *Rev Bras Reprodução Anim* 2012;36:105–12.
- [20] Rana N, Vaid RK, Phulia SK, Singh P. Assessment of bacterial diversity in fresh bubaline semen. *Indian J Anim Sci* 2012;82:596–8.
- [21] Le Bouguénec C, Schouler C. Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria. *Int J Med Microbiol* 2011;301:1–6. doi:10.1016/j.ijmm.2010.04.021.
- [22] Liberda J, Kraus M, Ryslavá H, Vlasáková M, Jonáková V, Tichá M. D-fructose-binding proteins in bull seminal plasma: isolation and characterization. *Folia Biol (Praha)* 2001;47:113–9.
- [23] Rutherford JC. The Emerging Role of Urease as a General Microbial Virulence Factor. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004062. doi:10.1371/journal.ppat.1004062.
- [24] Thibier M, Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000;62:233–51. doi:10.1016/S0378-4320(00)00161-5.
- [25] Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host

- Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:428–39. doi:10.1165/rcmb.2017-0321TR.
- [26] Goularte K, Madeira E, Ferreira C, Duval E, Vieira A, Mondadori R, et al. Hazard Analysis and Critical Control Points System for a Bull Semen Production Centre. *Reprod Domest Anim* 2015;50:972–9. doi:10.1111/rda.12617.
- [27] CBRA. MANUAL DO COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL 2013. 3^a. Belo Horizonte - MG: C. Animal; 2013.
- [28] Bergey DH, Boone DR. Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Volume 2, Part 3. vol. 2. 2nd ed. Philadelphia: Springer; 2001.
- [29] Carvalho AF, Saragó A, Azevedo SS, Batista CSA, Scarcelli E, Genovez ME. Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2012;64:83–90. doi:10.1590/S0102-09352012000100013.
- [30] Favero MS, McDade JJ, Robertsen JA, Hoffman RK, Edwards RW. Microbiological Sampling of Surfaces. *J Appl Bacteriol* 1968;31:336–43. doi:10.1111/j.1365-2672.1968.tb00375.x.
- [31] Dahlén G, Hassan H, Blomqvist S, Carlén A. Rapid urease test (RUT) for evaluation of urease activity in oral bacteria in vitro and in supragingival dental plaque ex vivo. *BMC Oral Health* 2018;18:89. doi:10.1186/s12903-018-0541-3.
- [32] Diemer, Huwe, Michelmann, Mayer, Schiefer, Weidner. Escherichia coli-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. *Int J Androl* 2000;23:178–86. doi:10.1046/j.1365-2605.2000.00224.x.
- [33] Zeyad A, Amor H, Eid Hammadeh M. The Impact of Bacterial Infections on Human Spermatozoa. *Int J Women's Heal Reprod Sci* 2017;5:243–52. doi:10.15296/ijwhr.2017.43.
- [34] Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef

- bulls. *Can J Vet Res* 2011;75:241–7.
- [35] Urata K, Narahara H, Tanaka Y, Egashira T, Takayama F, Miyakawa I. Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility. *Fertil Steril* 2001;76:163–6. doi:10.1016/S0015-0282(01)01850-7.
- [36] Gorga F, Galdiero M, Buommino E, Galdiero E. Porins and Lipopolysaccharide Induce Apoptosis in Human Spermatozoa. *Clin Diagnostic Lab Immunol* 2001;8:206–8. doi:10.1128/CDLI.8.1.206-208.2001.
- [37] E. Bennemann P, A. Machado S, K. Girardini L, Sonálio K, A. Tonin A. Contaminantes bacterianos y perfil de susceptibilidad del semen porcino en centros de recogida em Brasil. *Rev MVZ Córdoba* 2018:6637–48. doi:10.21897/rmvz.1338.
- [38] Dooley MP, Pineda MH, Naurer RR, Lunstra DD. Evidence for retrograde flow of spermatozoa into the urinary bladder of bulls during electroejaculation. *Theriogenology* 1986;26:101–9. doi:10.1016/0093-691X(86)90116-0.
- [39] Carvalho AF, Saragó A, Azevedo SS, Batista CSA, Scarcelli E, Genovez ME. Validação de nova proposta de espermocultura quantitativa aplicada a sêmen industrializado de touros. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2012;64:83–90. doi:10.1590/S0102-09352012000100013.
- [40] Wickware CL, Johnson TA, Koziol JH. Composition and diversity of the preputial microbiota in healthy bulls. *Theriogenology* 2020;145:231–7. doi:10.1016/j.theriogenology.2019.11.002.
- [41] Braz KMG, Monteiro FM, Fernandes LG, Rodrigues NN, Peixoto Jr K da C, Green RE, et al. Does bull temperament impact growth performance and semen quality? *Livest Sci* 2020;236:104038. doi:10.1016/j.livsci.2020.104038.
- [42] Gatermann S, Marre R. Cloning and expression of *Staphylococcus saprophyticus* urease gene sequences in *Staphylococcus carnosus* and contribution of the enzyme to virulence. *Infect Immun* 1989;57:2998–3002. doi:10.1128/IAI.57.10.2998-3002.1989.

- [43] Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2011.
- [44] King TE, Mann TRR. Sorbitol metabolism in spermatozoa. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci* 1959;151:226–43. doi:10.1098/rspb.1959.0061.
- [45] Lambertz J, Weiskirchen S, Landert S, Weiskirchen R. Fructose: A Dietary Sugar in Crosstalk with Microbiota Contributing to the Development and Progression of Non-Alcoholic Liver Disease. *Front Immunol* 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.01159.
- [46] Chapman JS. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegradation* 2003;51:271–6. doi:10.1016/S0964-8305(03)00044-1.
- [47] Langsrud S, Moretro T, Sundheim G. Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *J Appl Microbiol* 2003;95:186–95. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01968.x.
- [48] Li W, Huang Z, Wu Y, Wang H, Zhou X, Xiao Z, et al. Effectiveness of an optimized benzalkonium chloride gel as vaginal contraceptive: a randomized controlled trial among Chinese women. *Contraception* 2013;87:756–65. doi:10.1016/j.contraception.2012.09.012.
- [49] Kheirolomoom A, Kazemi-Vaysari A, Ardjmand M, Baradar-Khoshfetrat A. The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling. *Process Biochem* 1999;35:205–11. doi:10.1016/S0032-9592(99)00052-7.
- [50] Kassem AA, Ghazy FS, Shalaby SH. Effect of certain additives on stability of streptomycin sulphate. *Pharmazie* 1983;38:98–100.
- [51] Gunn GJ, Low JC. Analysis of passive surveillance data for antimicrobial resistance from cases of neonatal bovine enteritis. *Vet Rec* 2003;152:537–9.
- [52] Sáenz Y, Zarazaga M, Briñas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:353–8.

- [53] McKinnon BT, Avis KE. Membrane filtration of pharmaceutical solutions. *Am J Hosp Pharm* 1993;50:1921–36.
- [54] Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol* 2016;121:309–19. doi:10.1111/jam.13078.

NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA THERIOGENOLOGY



THERIOGENOLOGY

An International Journal of Animal Reproduction

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

● Description	p.1
● Audience	p.1
● Impact Factor	p.1
● Abstracting and Indexing	p.1
● Editorial Board	p.2
● Guide for Authors	p.3



DESCRIPTION

Theriogenology provides an international forum for researchers, clinicians, and industry professionals in **animal reproductive biology**. This acclaimed journal publishes articles on a wide range of topics in **reproductive and developmental biology**, of domestic mammal, avian, and aquatic species as well as wild species which are the object of veterinary care in research or conservation programs.

AUDIENCE

Individuals involved in animal reproduction biology.

IMPACT FACTOR

2019: 2.094 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Focus on: Veterinary Science and Medicine
AGRICOLA
CAB International

Global Health (Index Veterinarius, Veterinary Bulletin)

PubMed/Medline

BIOSIS Citation

Index Chemical

Abstracts

Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental

Sciences Elsevier BIOBASE

Science Citation Index

Derwent Biotechnology

Abstracts Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

F. Gandolfi, University of Milan, Department of Agricultural and Environmental Sciences - Production, Landscape, Agroenergy, Milano, Italy

Associate Editors

L. Brito, Madison, WI, United States

M-A. Driancourt, Astek, Boulogne Billancourt, France

Editorial Board

J. F. Asturiano, Polytechnic University of Valencia, Valencia, Spain

C. Aurich, University of Veterinary Medicine Vienna, Wien, Austria

M.R. Bakst, USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland, United States

I. Barrier Battut, National Professional School of Haras, Exmes, France

A. Blitek, Institute of Animal Reproduction and Food Research of the Polish Academy of Sciences, Department of Hormonal Action Mechanisms, Olsztyn, Poland

R. Boni, University of Basilicata, Potenza, Italy

S. Chastant, National Veterinary School Toulouse, Toulouse, France

P. Comizzoli, Smithsonian's National Zoo & Conservation Biology Institute, Washington, District of Columbia, United States

R.A. Dailey, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, United States

S. Eghbalsaeid, Islamic Azad University Isfahan Branch, Department of Animal Science, Isfahan, Iran, Islamic Republic of

F.C. Gwazdauskas, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, United States

S. Hochi, Shinshu University - Ueda Campus, Ueda, Japan

R. Kasimanickam, Washington State University, Pullman, Washington, United States

K. Kikuchi, National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan

A. K. McNeel, Zoetis Genetics, Kalamazoo, Michigan, United States

A. Menchaca, Institute of Animal Reproduction of Uruguay, Montevideo, Uruguay

S. Nagy, Pannon University Department of Animal Sciences, Keszthely, Hungary

C.E. Pope, Audubon Nature Institute, New Orleans, Louisiana, United States

V. H. Rao, Sri Venkateswara Veterinary University, Tirupati, India

J. Roca, University of Murcia, Department of Medicine and Animal Surgery, Murcia, Spain

M. Sharifi, Tarbiat Modares University, Department of Animal Science, Tehran, Iran, Islamic Republic of

A. Snider, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, United States

N. Songsasen, Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, United States

L. Spicer, Oklahoma State University, Department of Animal and Food Sciences, Stillwater, Oklahoma, United States

R. Ungerfeld, University of the Republic, Department of Veterinary Biosciences, Montevideo, Uruguay

B. K. Whitlock, The University of Tennessee Knoxville Institute of Agriculture, Knoxville, Tennessee, United States

M. Yeste, University of Girona, Girona, Spain

GUIDE FOR AUTHORS

Introduction

Please consult this Guide for Authors for further details on the requirements for submitting your paper to *Theriogenology*. The guidelines described in this document should be adhered to carefully, to ensure high-quality and rapid publication of your manuscript.

Aims and Scope

Theriogenology is an international, peer-reviewed journal that publishes papers regarding the study of reproduction in domestic and non-domestic mammals, birds, reptiles, and fish. *Theriogenology* publishes only material that has never been previously published and is not currently being considered for publication elsewhere; the exception would be limited disclosure (e.g. publication of an abstract or in the proceedings of a scientific conference, with limited circulation).

Types of Articles

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects within the scope of the journal that are of active current interest. They are usually invited, but prospective Authors may contact the Editors with proposals.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

It is recommended that the manuscript should be submitted in Word document

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements For further

information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms **sex and gender** should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-

holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding

author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. **Permission** of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has **preprinted forms** for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of **user license**.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/therio/default.aspx>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Pages and lines should be numbered.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all

affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non- standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired colorvision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork](#).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal

communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/theriogenology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. The elements of style. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. Introduction to the electronic age, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304. Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal Abbreviation Source

Journal names should be abbreviated according to Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>; List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>; CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply

'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of

the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published

open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an [open access fee](#) is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Additional Style Notes

Please use the following words, phrases, abbreviations, and stylistic conventions

- Avoid the word "injected," (e.g., "Cows were injected with cloprosteno") but include the generic name, proprietary name, dosage and route of administration (e.g., "Cows were treated with cloprosteno [Estrumate 500 µg im]").
- Either cite a P value (recommended for Abstract and for Results) or use the term 'significant' (recommended for Discussion), but generally avoid doing both.
- Terms with a specific statistical meaning (i.e. significant, tended and correlated), should only be used in a strict statistical context.
- Numbers less than 10 are written as a word, unless followed by an abbreviation for unit of measure,

e.g. five embryos, 5 min

Use the following expressions

- transrectal palpation, not rectal palpation
- nucleus transfer, not nuclear transplant
- estrus (noun) synchronization, but, estrous (adjective) behavior
- sperm can be used as both noun and adjective
- 120 to 125, not 120-125
- treatment by period, not treatment X period
- gravity: 100 X g (in lieu of speed for centrifugation)
- magnification: X 100
- identification number of an animal: No. 10, but 30 animals: n = 30
- 3 d, Day 3 (define Day 0)

Standard definitions

- oogonium: female gamete before meiosis
- oocyte, primary: female gamete from onset of the first maturation division (meiosis) to extrusion of the first polar body
- oocyte secondary: female gamete from onset of second meiosis to extrusion of the second polar body
- ovum: female gamete from the end of both meiotic divisions until the union of the male and female pronuclei (differs from the common use of ovum as a general term for any female gamete)

- germinal vesicle: nucleus of the ovum
- zygote: a fertilized ovum, from fusion of the male and female gamete to completion of first cleavage
- embryo: a conceptus from the 2-cell stage to the stage when cell migration and differentiation are largely complete
- fetus: a conceptus after organogenesis is mostly complete (primarily increasing in size)
- conceptus: an embryo or fetus with all its membranes and accessory structures
- abortion: expulsion of a conceptus incapable of independent life
- premature parturition: expulsion (before full term) of a conceptus capable of independent life
- stillbirth: avoid this term (use fetal death or abortion)

Abbreviations

Never use an abbreviation to start a sentence. Some abbreviations may be used anywhere else, including the manuscript's title and in figures, table titles and legends, without definition; others may not be used in the title, but may be used in the text without definition. In general, abbreviations must be defined when used for the first time (this may be avoided in the ABSTRACT if necessary to conserve space). To make reading the paper more pleasant, avoid using excessive abbreviations and acronyms; instead use short synonyms, for instance: for "Cesarean section" instead of "CS" use "section" or "hysterotomy."

The following abbreviations may be used in the text without definition (note that abbreviations exclude periods):

theriochart.jpgchart

Units of Measure

cpm - counts per min

dpm -

disintegration

s per min g -

gram

ga - gauge of

hypodermic

needle h - hour

k

g

-

k

i

l

o

g

r

a

m

L

-

I

i
t
e
r
m
L

-

m
i
l
i
l
i
t
e
r

μ
L

-

m
i
c
r
o
l
i
t
e
r

m

-

m
e
t
e
r

m
i
n

-

m
i
n
u
t
e

m
o

-

m
o
n
t
h
s - second

v:v

-

vol
um
e
rati
o
wk

-

we
ek

wt/vol -
weight per
volume y -
year

Routes of treatment

id -

intr

ade

rma

l im

-

intr

am

usc

ular

iu -

intr

aut

erin

e

iv -

intr

ave

no

us

sc

-

su

bc

uta

ne

ou

s

po

-

ora

I

Statistical

expressions

ANOVA -

analysis of

variance **CV -**

coefficient of

variation **df -**

degrees of

freedom

F -

vari

anc

e

ratio

NS -

not

sign

ifica

nt P

-

prob

abili

ty

SD - standard deviation

SEM - standard

error of the mean

r - correlation

coefficient

r² - coefficient of regression

Additional information

- For issues of style and format not addressed here, please consult Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers, Sixth Edition.

- For spelling, word formation and divisions, plurals, possessives, meanings and usage, consult the CBE Manual or a current English language (collegiate-level or higher) dictionary.
- For conflicts between instructions in this Guide and any of the references, the Guide takes precedence. Do not hesitate to contact the Editorial Office if you have any questions regarding preparation of your manuscript.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this

stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published. © Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

