

## A influência da idade na resistência à refrigeração do sêmen de garanhões

André Luiz Silva Zoccoli<sup>1</sup>, Eligiane Priscila Meurer<sup>1</sup>, Pedro Sanches Oquendo Junior<sup>2,3</sup>, Leonardo Batissaco<sup>4</sup>,  
Fabiana Maddalena de Gaspari Oquendo<sup>2,3</sup>, Renata Lançoni<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil. <sup>3</sup> Gallop Central de Reprodução Equina, Uberlândia, MG, Brasil

<sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPAR), Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ – USP)

\*E-mail: renata.lanconi@ufu.br

A espécie equina geralmente é selecionada pelo padrão racial e performance atlética, sendo assim, pouca atenção é dada para o desempenho reprodutivo. Além disso, é comum o uso de animais idosos para a reprodução, os quais possuem maiores probabilidades de estarem com sua função reprodutiva afetada. Na reprodução equina, existe disseminada utilização do uso de sêmen refrigerado, o qual possui muitas vantagens para o melhoramento genético das diversas raças e aptidões, porém, existe variação entre os garanhões em relação a viabilidade dos espermatozoides, capacidade de fertilização e resistência às biotécnicas aplicadas, entre elas a refrigeração de sêmen. O envelhecimento do animal é uma das causas que pode interferir na qualidade seminal devido a vários fatores, dentre eles, diferentes graus de degeneração testicular que podem estar relacionados com o avanço da idade. Então, o objetivo deste trabalho foi avaliar se existe diferença na resistência à refrigeração do sêmen em garanhões de diferentes idades. Para isso, 5 animais foram separados em dois grupos: animais jovens (2 garanhões com até 8 anos de idade) e animais idosos (3 garanhões a partir de 12 anos). Realizaram-se 2 colheitas seminais por animal. Logo após a colheita o sêmen era diluído em diluidor a base de leite desnatado (Botusemen<sup>®</sup>) na concentração de 25 a 50 milhões de espermatozoides/mL. As avaliações de motilidade total (%) e vigor (1-5) subjetivos, em microscopia óptica de luz, e integridade de membrana plasmática (% de membrana plasmática lesada – MPL), pela técnica de eosina-nigrosina, foram realizadas em dois momentos: logo após a colheita (MOT 1, VIG 1, MPL 1) e após 6 horas de refrigeração em caixa isotérmica de transporte passivo (Botuflex<sup>®</sup>) à 15°C (MOT 2, VIG 2, MPL 2). Além disso, também foram realizadas em todos os ejaculados análises da concentração (em câmara de Neubauer) e morfologia espermática (microscopia de contraste de fase). Os dados coletados foram comparados utilizando o programa Statistical Analyses Systems (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) e previamente verificados quanto a normalidade dos resíduos através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não respeitaram a normalidade foram transformados e/ou feita a retirada de outliers. Quando mesmo após transformação e/ou retirada dos outliers não respeitaram as premissas, foram analisados por estatística não paramétrica de ordem, sendo feita a análise através do teste de Kruskal-Wallis (PROC NPAR1WAY). Os dados normais ou transformados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA), seguido da observação de diferenças entre os grupos, quando significativa, pelo teste T (PROC TTEST). Os resultados foram apresentados em forma de média e desvio padrão. Para todas as comparações foi utilizado o nível de significância estatística de 5% ( $p \leq 0,05$ ), e o nível de tendência estatística de 10% ( $0,05 < p < 0,1$ ). A MOT1 apresentou valores de 52,5 ( $\pm 32,78$ ) nos animais jovens e 31 ( $\pm 20,12$ ) nos animais idosos. A MOT 2 foi de 41,25 ( $\pm 33,75$ ) em animais jovens e 18,00 ( $\pm 13,50$ ) nos animais idosos. O VIG 1 foi de 2,75 ( $\pm 1,5$ ) para garanhões jovens e 2,20 ( $\pm 0,84$ ) para garanhões idosos. O VIG2 foi de 2,5 ( $\pm 1,29$ ) para os jovens e 1,4 ( $\pm 0,54$ ) para os idosos. A MPL1 apresentou 44,62 ( $\pm 11,27$ ) nos garanhões jovens e 36,6 ( $\pm 16,44$ ) nos garanhões idosos. Após a refrigeração, os valores de MPL2 foram 47,25 ( $\pm 10,52$ ) e 36 ( $\pm 14,5$ ) em jovens e idosos, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os resultados de concentração e morfologia espermática nos diferentes grupos experimentais. Apesar da diferença numérica considerável na motilidade e integridades de membrana entre os grupos (garanhões jovens x garanhões idosos), não houve diferença estatística, possivelmente devido ao baixo número de animais, levando a um grande desvio padrão. Provavelmente, se este experimento fosse ampliado para maior número de animais e colheitas, seria possível notar diferença entre a resistência à refrigeração do sêmen em diferentes idades, sugerindo estudos futuros e continuidade das pesquisas.

**Palavras-chave:** sêmen refrigerado, equino, garanhão, biotécnica.

## The influence of age on the resistance to the cooling process of stallion semen

André Luiz Silva Zoccoli<sup>1</sup>, Eligiane Priscila Meurer<sup>1</sup>, Pedro Sanches Oquendo Junior<sup>2,3</sup>, Leonardo Batissaco<sup>4</sup>,  
Fabiana Maddalena de Gaspari Oquendo<sup>2,3</sup>, Renata Lançoni<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil. <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (PPGCVET – FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil. <sup>3</sup>Gallop Central de Reprodução Equina, Uberlândia, MG, Brasil. <sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPAR), Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ – USP)

\*E-mail: renata.lanconi@ufu.br

The equine species is usually selected for breed pattern and athletic performance, so little attention is paid to reproductive performance. In addition, it is common to use older animals for reproduction, which are more likely to have their reproductive function affected. In equine reproduction, there is widespread use of the use of refrigerated semen, which has many advantages for the genetic improvement of different breeds and aptitudes, however, there is variation among stallions in relation to sperm viability, fertilization capacity and resistance to biotechnologies. applied, including semen refrigeration. The aging of the animal is one of the causes that can interfere with seminal quality due to several factors, among them, different degrees of testicular degeneration that may be related to advancing age. So, the objective of this work was to evaluate if there is a difference in the resistance to the semen cooling process in stallions of different ages. Then, 5 animals were separated into two groups: young animals (2 stallions up to 8 years old) and elderly animals (3 stallions from 12 years old). Two seminal collections were performed per animal. Immediately after collection, the semen was diluted in a skim milk-based extender (Botusemen<sup>®</sup>) at a concentration of 25 to 50 million sperm/mL. Subjective total motility (%) and vigor (1-5) assessments, under optical light microscopy and membrane integrity (% of damaged plasma membrane – DPM by the eosin-nigrosin technique) were performed at two moments: immediately after collection (MOT1, VIG1, DPM1) and after 6 hours of refrigeration in an isothermal passive transport box (Botuflex<sup>®</sup>) at 15°C (MOT2, VIG2, DPM2). In addition, analyzes of sperm concentration (in Neubauer chamber) and morphology (phase contrast microscopy) were also performed in all ejaculates. The collected data were compared with the Statistical Analyzes Systems program (SAS version 9.4; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) and previously verified for normality using the Shapiro-Wilk test. Data that did not respect normality were transformed and/or outliers were removed. When even after transformation and/or removal of outliers they did not respect the premises, they were analyzed by non-parametric order statistics, and the analysis was performed using the Kruskal-Wallis test (PROC NPARIWAY). Normal or transformed data were submitted to the analysis of variance test (ANOVA), followed by the observation of differences between the groups, when significant, by the T test (PROC TTEST). The results were presented as mean and standard deviation. For all comparisons, a statistical significance level of 5% ( $p \leq 0.05$ ) and a statistical trend level of 10% ( $0.05 < p < 0.1$ ) were used. MOT1 presented values of 52.5 ( $\pm 32.78$ ) in young animals and 31 ( $\pm 20.12$ ) in aged animals. MOT 2 was 41.25 ( $\pm 33.75$ ) in young animals and 18.00 ( $\pm 13.50$ ) in aged animals. VIG 1 2.75 ( $\pm 1.5$ ) for young stallions and 2.20 ( $\pm 0.84$ ) for old stallions. VIG2 2.5 ( $\pm 1.29$ ) for young and 1.4 ( $\pm 0.54$ ) for the elderly. As for membrane integrity in analyzes performed by the eosin-nigrosin staining technique, MPL1 44.62 ( $\pm 11.27$ ) in young stallions and 36.6 ( $\pm 16.44$ ) in aged stallions. After the refrigeration time, MPL2 values were 47.25 ( $\pm 10.52$ ) and 36 ( $\pm 14.5$ ) in young and old, respectively. There was no statistical difference between the results of sperm concentration and morphology in the different experimental groups. Despite the considerable numerical difference in motility and membrane integrity between the groups (young stallions x aged stallions), there was no statistical difference, possibly due to the low number of animals, leading to a large standard deviation. Probably, if this experiment were extended to a greater number of animals and samples, it would be possible to notice a difference between the resistance to refrigeration of the semen at different ages, suggesting future studies and continuity of research.

**Keywords:** cooled semen, horse, stallion, biotechnology.

## Alterações morfológicas de espermatozoides equinos após longo repouso sexual, avaliadas durante esgotamento das reservas espermáticas gonadais

Iara Magalhães Ribeiro<sup>1</sup>, Cristian Silva Teixeira<sup>2</sup>, Thiago Vieira e Silva<sup>2</sup>, Ana Clara Bueno Gomes<sup>1</sup>, Gabriella Soares Pires<sup>1</sup> e Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa  
\*E-mail: yame@ufv.br

Após um período de repouso sexual, recomenda-se a realização de repetidas coletas de sêmen, para que ocorra uma renovação de células senescentes por células sadias nas reservas espermáticas extragonadais. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas ao longo do período de esgotamento das reservas espermáticas extragonadais de equinos, visando quantificar e monitorar os dias com maior incidência de defeitos maiores e menores e analisar a ocorrência de regressão dos mesmos. Foram utilizados cinco garanhões (três Mangalargas Marchadores e dois Bretões) com idades entre 3 a 8 anos, pertencentes à Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Equideocultura da Universidade Federal de Viçosa. Todos os animais utilizados no estudo apresentavam-se saudáveis, sem histórico de alterações reprodutivas, e foram mantidos em repouso sexual durante um período de 60 dias. Após esse período, iniciaram-se as coletas seminais com o auxílio de vagina artificial modelo Botucatu<sup>®</sup> em manequim, após estimulação com égua em cio, uma vez ao dia durante 9 dias consecutivos. Após a obtenção do sêmen, procedeu-se a confecção de lâminas de esfregaço seminal com o sêmen *in natura* em lâminas de vidro para microscopia, visando a análise da morfologia espermática. Os esfregaços foram corados utilizando kit de corantes Panótico Rápido (Renylab, Barbacena-MG, Brasil), submergindo as lâminas durante 15 segundos em cada solução, conforme especificação do fabricante. As mesmas foram analisadas por meio de microscopia óptica em aumento de 1000x utilizando óleo de imersão. Um total de 200 células espermáticas foram avaliadas e contabilizadas, sendo classificadas em normais e anormais, e subclassificadas, conforme os defeitos encontrados: em defeitos maiores e defeitos menores. A contagem diferencial das alterações morfológicas também foi realizada, descrevendo-se os defeitos de cabeça, peça intermediária, cauda, persistência de gota citoplasmática e formas múltiplas. Quando observados dois ou mais defeitos na mesma célula, registrou-se o defeito de maior gravidade e os valores foram expressos em porcentagem. Dentre os defeitos maiores, houve um maior percentual total de cauda fortemente dobrada ou enrolada (33,22%) e de gota citoplasmática proximal (22,33%) em relação aos defeitos de cabeça (14,22%), de peça intermediária (11,5%) e de acrossoma (0,77%). Já dentre os defeitos menores, o maior percentual foi de defeitos de cabeça (23,55%) e de gota citoplasmática distal (21,44%) em relação aos defeitos de cauda e implantação (8%). De acordo com os valores obtidos no teste de Tukey (considerando  $\alpha = 5\%$ ), houve diferença estatística apenas em relação aos defeitos menores e às gotas citoplasmáticas, diminuindo ao longo das coletas. Dentre os defeitos menores, a porcentagem de defeitos de cabeça reduziu de 31% no segundo dia para 13% no nono dia de coleta; os defeitos de cauda reduziram de 14% no segundo dia para 9% no nono dia. Em relação às gotas citoplasmáticas, houve uma diminuição de 66% no primeiro dia para 22% no último dia de coleta. Durante o processo fisiológico de maturação do espermatozoide no epidídimo, a gota citoplasmática deve migrar da porção proximal da peça intermediária para sua porção distal e então, finalmente destacar-se. Entretanto, um animal que se encontra em um período longo de repouso sexual pode apresentar um maior número de espermatozoides com gotas citoplasmáticas, provavelmente devido a uma diminuição do trânsito epididimário, tendo como consequência o não desprendimento da gota. Desse modo, pode-se concluir que o repouso sexual contribui para o aparecimento de defeitos espermáticos e para persistência de gotas citoplasmáticas, podendo ser reversível adotando-se colheitas periódicas, que consequentemente levam ao desaparecimento desta patologia.

**Palavras-chave:** patologia espermática, manejo reprodutivo, trânsito epididimário, fisiologia espermática.

## Morphological changes of equine spermatozoa after long sexual rest, evaluated during depletion of gonadal sperm reserves

Iara Magalhães Ribeiro<sup>1</sup>, Cristian Silva Teixeira<sup>2</sup>, Thiago Vieira e Silva<sup>2</sup>, Ana Clara Bueno Gomes<sup>1</sup>, Gabriella Soares Pires<sup>1</sup> e Yamê Fabres Robaina Sancler-Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary – Universidade Federal de Viçosa; <sup>2</sup>Department of Animal Science – Universidade Federal de Viçosa  
\*E-mail: yame@ufv.br

After a period of sexual rest, it is recommended to carry out repeated collections of semen, so that there is a renewal of senescent cells by healthy cells in the extragonadal sperm reserves. Thus, the present study aimed to evaluate the morphological changes during the period of depletion of the extragonadal sperm reserves of horses, aiming to quantify and monitor the days with the highest incidence of major and minor defects and to analyze the occurrence of their regression. Five stallions were used (three Mangalargas Marchadores and two Bretons) aged between 3 and 8 years, belonging to the Unit of Teaching, Research and Extension of Equid Science at the Federal University of Viçosa. All animals used in the study were healthy, with no history of reproductive disturbance, and were kept on sexual rest for a period of 60 days. After this period, seminal collections began with the aid of an artificial vagina model Botucatu<sup>®</sup> on a phantom, after stimulation with a mare in estrus, once a day for 9 consecutive days. After obtaining the semen, seminal smear slides were made with the raw semen on glass slides for microscopy, aiming the analysis of sperm morphology. The smears were stained using the a Diff-Quick kit Rápido (Renylab, Barbacena-MG, Brazil), submerging the slides for 15 seconds in each solution, as specified by the manufacturer. The smears were analyzed by optical microscopy at 1000x magnification using immersion oil. A total of 200 sperm cells were evaluated and counted, being classified as normal and abnormal, and subclassified, according to the defects found: into major defects and minor defects. Differential counting of morphological alterations was also performed, describing defects in the head, midpiece, tail, persistence of cytoplasmic droplet and multiple forms. When two or more defects were observed in the same cell, the defect with the greatest severity was recorded and the values were expressed as a percentage. Among the major defects, there was a higher total percentage of strongly bent or curled tail (33.22%) and of proximal cytoplasmic drop (22.33%) in relation to head defects (14.22%), of midpiece (11.5%) and acrosome (0.77%). Among the minor defects, the highest percentage were head defects (23.55%) and distal cytoplasmic droplet (21.44%) in relation to tail (8%). According to the values obtained in the Tukey test (considering  $\alpha = 5\%$ ), there was a statistical difference only in relation to minor defects and cytoplasmic drops, decreasing throughout the collections. Among the minor defects, the percentage of head defects reduced from 31% on the second day to 13% on the ninth day of collection; tail defects reduced from 14% on the second day to 9% on the ninth day. Regarding cytoplasmic drops, there was a decrease from 66% on the first day to 22% on the last day of collection. During the physiological process of sperm maturation in the epididymis, the cytoplasmic droplet must migrate from the proximal portion of the midpiece to its distal portion and then finally detach. However, an animal that is in a long period of sexual rest may have a greater number of spermatozoa with cytoplasmic droplets, probably due to a decrease in epididymal transit, resulting in the non-detachment of the drop. Thus, it can be concluded that sexual rest contributes to the appearance of sperm defects and to the persistence of cytoplasmic droplets, which may be reversible by adopting periodic collections, which consequently lead to the disappearance of this pathology.

**Keywords:** sperm pathology, reproductive management, epididymal transit, sperm physiology.

## **Congelamento de espermatozoides equinos com a adição do extrato de folha da *Eugenia uniflora* L (pitanga) ao meio diluidor comercial**

**Daniel Campos Giosa<sup>1</sup>, Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>3</sup>, André Maciel Crespilho<sup>4</sup>, Bruno Argenton de Barros<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>2</sup>, Ana Caroline Chaves Vall Nicolás<sup>2</sup>, Rosiara Rosaria Dias Maziero Guaitolini<sup>1, 2\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com ênfase em produtos bioativos – UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil; <sup>2</sup>CRV Brazil, Ribeirão Preto, SP, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Mestrado em bem-estar animal – UNISA, São Paulo, SP, Brasil

\*E-mail: rosiaramaziero@gmail.com

As biotécnicas reprodutivas em equinos estão em constante aprimoramento e a criopreservação espermática é uma das mais utilizadas, por permitir a rápida disseminação de material genético de animais geneticamente superiores. Porém, a criopreservação provoca injúrias às células espermáticas, entre elas a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs, quando em excesso, promovem lesão à membrana plasmática do espermatozoide, diminuindo a sua viabilidade. Neste sentido, antioxidantes atuam no combate aos efeitos nocivos provocados pelos radicais livres, proporcionando melhor qualidade ao sêmen fresco, refrigerado e congelado. A *Eugenia uniflora* L, popularmente conhecida como pitangueira, apresenta compostos fenólicos com ação antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e a lipoperoxidação *in vitro*. Estes compostos desempenham um papel importante, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Entretanto não existem relatos na literatura sobre a utilização do extrato de folhas da pitanga, como agente antioxidante adicionado ao meio diluidor para sêmen equino. Assim, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da fração solúvel em etanol das folhas da *E. uniflora* adicionado ao meio diluidor comercial para melhorar a cinética do sêmen equino criopreservado. Foram utilizados quatro garanhões da raça Quarto de Milha, com idade entre 7 a 9 anos, selecionados de acordo com o exame andrológico prévio. Foram colhidas 5 amostras de ejaculados, utilizando vagina artificial, com análise imediata quanto à motilidade, vigor espermático, morfologia espermática e integridade de membrana plasmática. Os ejaculados foram diluídos conforme os grupos experimentais: 1) grupo controle: diluidor BotuCrio<sup>®</sup>; 2) grupo 1: diluidor BotuCrio<sup>®</sup>, com a adição de extrato de *E. uniflora* na concentração de 1 mg para cada 120 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por mL e 3) grupo 2: diluidor BotuCrio<sup>®</sup>, com a adição de extrato de *E. uniflora* na concentração de 2 mg para cada 120 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por mL. Em seguida, as amostras foram submetidas ao processo de congelamento. Após a descongelamento, as amostras foram analisadas em sistema computadorizado (CASA – IVOS Hamilton Thorne) para avaliação da cinética espermática [motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade do trajeto (VAP:  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade linear (VSL:  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL:  $\mu\text{m/s}$ ), porcentagem de espermatozoides rápidos (RAP: %), linearidade (LIN: %)]. De acordo com as análises realizadas, não houve diferença entre os parâmetros de cinética espermáticas entre o grupo controle e os grupos 1 e 2 ( $P > 0,05$ ). Pôde-se concluir então, que a adição da fração solúvel em etanol das folhas da *E. uniflora* ao ejaculado equino, não altera a cinética espermática pós-descongelamento.

**Palavras-chave:** Análises espermáticas. Antioxidante. Criopreservação. Pitanga. Sêmen equino.

## Freezing of equine sperm with the addition of *Eugenia uniflora* L (pitanga) leaf extract to commercial extender medium

Daniel Campos Giosa<sup>1</sup>, Carlos Renato de Freitas Guaitolini<sup>2</sup>, Maria Isabel Mello Martins<sup>3</sup>, André Maciel Crespilha<sup>4</sup>, Bruno Argenton de Barros<sup>1</sup>, Luana Gomes Fernandes<sup>2</sup>, Ana Caroline Chaves Vall Nicolás<sup>2</sup>, Rosiara Rosaria Dias Maziero Guaitolini<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal com ênfase em produtos bioativos – UNIPAR, Umuarama, PR, Brasil; <sup>2</sup>CRV Brazil, Ribeirão Preto, SP, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, PR, Brasil; <sup>4</sup>Programa de Mestrado em bem-estar animal – UNISA, São Paulo, SP, Brasil

\*E-mail: rosiaramaziero@gmail.com

Reproductive biotechniques in horses are in constant improvement and sperm cryopreservation is one of the most used, as it allows the rapid dissemination of genetic material from genetically superior animals. However, cryopreservation causes injuries to sperm cells, including the exacerbated production of reactive oxygen species (ROS). ROS when in excess, promote damage to the sperm plasma membrane, reducing its viability. In this sense, antioxidants act to combat the harmful effects caused by free radicals, providing better quality for fresh, chilled and frozen semen. *Eugenia uniflora* L, popularly known as Pitangueira, has phenolic compounds with antioxidant action, inhibiting lipid peroxidation and *in vitro* lipoperoxidation. These compounds play an important role, acting both in the initial stage and in the propagation of the oxidative process. However, there are no reports in the literature on the use of pitanga leaf extract as an antioxidant agent added to the dilution medium for equine semen. Thus, this study aimed to evaluate the effects of the ethanol-soluble fraction of *E. uniflora* leaves added to commercial dilution medium to improve the kinetics of cryopreserved equine semen. Four “Quarto de milha” stallions, aged between 7 and 9 years, selected according to the previous andrological examination, were used. Five ejaculate samples were collected using artificial vagina, with immediate analysis for motility, sperm vigor, sperm morphology and plasma membrane integrity. The ejaculates were diluted according to the experimental groups: 1) control group: BotuCrio® dilution medium; 2) group 1: BotuCrio® dilution medium, with the addition of *E. uniflora* extract in a concentration of 1 mg for each  $120 \times 10^6$  spermatozoa per mL and 3) group 2: BotuCrio® dilution medium, with the addition of *E. uniflora* extract at a concentration of 2 mg for every  $120 \times 10^6$  spermatozoa per mL. Then, the samples were submitted to the freezing process. After thawing, the samples were analyzed in a computerized system (CASA – IVOS Hamilton Thorne) to evaluate sperm kinetics [total motility (%), progressive motility (%), time-average velocity (VAP:  $\mu\text{m/s}$ ), linear velocity (VSL:  $\mu\text{m/s}$ ), curvilinear velocity (VCL:  $\mu\text{m/s}$ ), percentage of fast sperm (RAP: %), linearity (LIN: %)]. According to the analysis performed, there was no difference between the sperm kinetics parameters between the control group and groups 1 and 2 ( $P > 0.05$ ). It was concluded that the addition of the ethanol-soluble fraction of *E. uniflora* leaves to the equine ejaculate does not alter the post-thawing sperm kinetics.

**Keywords:** Antioxidant, cryopreservation, Equine semen, Pitanga, Sperm analysis.

## É possível refrigerar sêmen equino a 5° C com o meio BWW modificado?

Larissa Rodrigues de Santana<sup>1</sup>, William Morais Machado<sup>1</sup>, Thalita Marques Brito<sup>1</sup>, Maíra Guimarães Kersul<sup>1</sup>,  
Diego Passos Guimarães<sup>1</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal (LARA), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia, Brasil

\*E-mail: larirodriguesvet@gmail.com

Comumente observamos espermatozoides mais sensíveis à refrigeração entre os garanhões quando comparados aos machos de outras espécies domésticas como touros, bodes e cães. Devido a esta característica, faz-se necessário utilizar componentes que aumentem a viabilidade e resistência espermática ao choque frio durante a formulação de diluidores de sêmen para refrigeração. A utilização do meio descrito por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW), com a incorporação de determinadas moléculas, dentre elas a L-carnitina, é capaz de manter o sêmen equino preservado em temperatura ambiente por longos períodos. Todavia, este meio não tem sido utilizado para a refrigeração, apesar de conter componentes que fornecem substratos energéticos para importantes funções celulares, como a glicose e o piruvato de sódio. O objetivo deste estudo foi utilizar o meio quimicamente definido BWW para refrigerar a 5°C o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador com adição de: a) ácido docosahexaenoico (DHA), um ácido graxo poliinsaturado capaz de ser incorporado na membrana plasmática conferindo fluidez; b) rosiglitazona (ROSI), substância moduladora do metabolismo energético; c) lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que dentre suas funções, evita o efluxo de colesterol e fosfolípidios da membrana celular e suas associações. Para realização desse experimento, foram coletados quatro ejaculados de quatro garanhões por meio de vagina artificial. O sêmen foi diluído para obtenção de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/mL nos diferentes diluidores, formando os seguintes grupos experimentais: D1) BotuSêmen<sup>®</sup>; D2) BWW; D3) BWW +  $30\text{ng/mL}^{-1}$  de DHA +  $50 \mu\text{M}$  de ROSI; D4) BWW +  $50 \mu\text{M}$  de ROSI; D5) BWW +  $30\text{ng/mL}^{-1}$  de DHA; D6) BWW + 10% de LDL +  $30\text{ng/mL}^{-1}$  de DHA +  $50 \mu\text{M}$  de ROSI; D7) BWW + 10% de LDL +  $30\text{ng/mL}^{-1}$  de DHA; D8) BWW + 10% de LDL +  $50 \mu\text{M}$  de ROSI; D9) BWW + 10% de LDL. As amostras diluídas foram submetidas à refrigeração em caixa BotuFlex<sup>®</sup> até atingir a temperatura de 5°C, posteriormente transferidas cuidadosamente para refrigeradora MiniTube<sup>®</sup>, evitando a mudança de temperatura da amostra e dando continuidade ao armazenamento na mesma temperatura por até 48 horas. Avaliamos o efeito dos diluidores sobre os espermatozoides através dos parâmetros de cinemática pelo SCA Evolution<sup>®</sup>. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso e os dados foram submetidos a ANOVA para testar as diferenças entre os diluidores no software SPSS, com um nível de significância a 5%. O diluidor BWW contendo LDL (D9) e associação de LDL+ ROSI (D8) foram estatisticamente inferiores em preservar a motilidade total e progressiva quando comparados ao diluidor BotuSêmen<sup>®</sup>. Os espermatozoides refrigerados em BWW adicionado de LDL + DHA + ROSI (D6), contendo LDL + ROSI (D8) e apenas LDL (D9) apresentaram VCL e VAP estatisticamente inferior quando comparado ao grupo controle. Todos os diluidores contendo BWW preservaram a VSL inferior ao meio controle ( $P < 0,05$ ). Todos os diluidores contendo LDL resultaram em espermatozoides com menor linearidade (D6, D7, D8 e D9;  $P < 0,05$ ). Os diluidores BWW + LDL + DHA (D7) e BWW + LDL + ROSI (D8) não garantiram a retilinearidade dos espermatozoides como o BotuSêmen<sup>®</sup> ( $P < 0,05$ ). Os meios BWW + LDL+ DHA (D7) e o BWW + LDL + ROSI (D8) resultaram nos piores resultados de BCF ( $P < 0,05$ ), enquanto o BWW + LDL + ROSI (D8) resultou em ALH inferior ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Embora o meio BWW com modificações seja uma alternativa promissora para ser utilizado na conservação de sêmen, observamos que, no caso de refrigeração de sêmen a 5°C, o comportamento destes diluidores não foi homogêneo, pois resultou em um percentual alto (80%) de amostras que não sobreviveram ao processo de refrigeração por 48 horas. A LDL na concentração estudada não maximizou o potencial do meio BWW para refrigeração, com a desvantagem de ser um produto extraído da gema de ovo, podendo resultar em risco sanitário.

**Palavras-chave:** Espermatozoides, DHA, Rosiglitazona, LDL.

## Is it possible to cool equine semen to 5° C with modified BWW extenders?

Larissa Rodrigues de Santana<sup>1\*</sup>, William Morais Machado<sup>1</sup>, Thalita Marques Brito<sup>1</sup>, Máira Guimarães Kersul<sup>1</sup>,  
Diego Passos Guimarães<sup>1</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Reproduction Laboratory (LARA), State University of Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia, Brazil

\*Email: larirodriguesvet@gmail.com

Commonly we observe that sperm are more sensitive to cooling among stallions when compared to males of other domestic species such as bulls, goats and dogs. Due to this characteristic, it is necessary to use components that increase the viability and sperm resistance to cold shock during the formulation of semen extenders for cooling. The use of the medium described by Biggers, Whitten and Whittingham (BWW), with the incorporation of certain molecules, including L-carnitine, is capable of keeping equine semen preserved at room temperature for long periods. However, this medium has not been used for cooling, despite containing components that provide energy substrates for important cellular functions, such as glucose and sodium pyruvate. The aim of this study was to use the chemically defined BWW medium to cool the semen of Mangalarga Marchador stallions at 5°C with the addition of: a) docosahexaenoic acid (DHA), a polyunsaturated fatty acid capable of being incorporated into the plasma membrane, providing fluidity; b) rosiglitazone (ROSI), a substance that modulates energy metabolism; c) low-density lipoproteins (LDL), which among its functions, prevents the efflux of cholesterol and phospholipids from the cell membrane and their associations. To carry out this experiment, four ejaculates were collected from four stallions through an artificial vagina. The semen was diluted to obtain  $25 \times 10^6$  sperm/mL in the different extenders, forming the following experimental groups: D1) BotuSêmen<sup>®</sup>; D2) BWW; D3) BWW + 30ng/mL<sup>-1</sup> of DHA + 50 µM of ROSI; D4) BWW + 50 µM ROSI; D5) BWW + 30ng/mL<sup>-1</sup> DHA; D6) BWW + 10% LDL+ 30ng/mL<sup>-1</sup> DHA + 50 µM ROSI; D7) BWW + 10% LDL+ 30ng/mL<sup>-1</sup> DHA; D8) BWW + 10% LDL + 50 µM ROSI; D9) BWW + 10% LDL. The diluted samples were submitted to cool in a BotuFlex<sup>®</sup> box until reaching a temperature of 5 °C, then carefully transferred to a MiniTube<sup>®</sup> refrigerator, avoiding the sample temperature change and continuing the storage at the same temperature for up to 48 hours. We evaluated the effect of extenders on sperm through kinematics parameters by SCA Evolution<sup>®</sup>. The experimental design was in randomized blocks and the data were submitted to ANOVA to test the differences between the extenders in the SPSS software, with a significance level of 5%. The BWW extender containing LDL (D9) and the association of LDL + ROSI (D8) were statistically inferior in preserving total and progressive motility when compared to the BotuSêmen<sup>®</sup> extender. Sperms cooled in BWW added with LDL + DHA + ROSI (D6), containing LDL + ROSI (D8) and only LDL (D9) showed statistically lower VCL and VAP when compared to the control group. All extenders containing BWW preserved VSL lower than the control medium ( $P < 0.05$ ). All extenders containing LDL resulted in sperm with lower linearity (D6, D7, D8 and D9;  $P < 0.05$ ). The extenders BWW + LDL + DHA (D7) and BWW + LDL + ROSI (D8) did not guarantee the straightness of sperms, as did BotuSemen<sup>®</sup> ( $P < 0.05$ ). BWW + LDL+ DHA (D7) and BWW + LDL + ROSI (D8) resulted in the worst BCF results ( $P < 0.05$ ), while BWW + LDL + ROSI (D8) resulted in lower ALH than the control group ( $P < 0.05$ ). Although the BWW medium with modifications is a promising alternative to be used in semen conservation, we observed that, in the case of semen cooling at 5°C, the behavior of these extenders was not homogeneous, as it resulted in a high percentage (80%) of samples that did not survive the cooling process for 48 hours. LDL at the concentration studied did not maximize the potential of the BWW medium for cooling, with the disadvantage of being a product extracted from egg yolk, which could result in a health risk.

**Keywords:** Sperm, DHA, Rosiglitazone, LDL.

## Efeito da adição dietética de óleo de soja na composição corporal e na reprodução de garanhões

Luiza Vitarelli Kladt<sup>1</sup>, Cristian Silva Teixeira<sup>2</sup>, Ytalo Galinari Henriques Schuartz<sup>1</sup>, Ícaro Artuso Lage<sup>1</sup>,  
Hermano Monteiro de Barros Pereira<sup>2</sup>, Caroline Bittencourt de Sá<sup>2</sup>, Patrícia Reis de Moraes<sup>2</sup>, Yame Fabres  
Robaina Sancler-Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa.  
\*E-mail: luiza.kladt@ufv.br

A utilização de suplementos na dieta de equinos é uma prática crescente nas criações, sendo o uso de óleos vegetais uma das alternativas de suplementação. Os óleos vegetais são substâncias naturais derivados de sementes que em sua composição apresentam a união entre uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos graxos. A utilização dos óleos vegetais na dieta de equinos se dá como complemento energético aos carboidratos, visto que eles se apresentam como fontes de energia prontamente disponíveis para o consumo. Além disso, o colesterol presente, tem papel fundamental na estabilidade da bicamada fosfolipídica de células espermáticas reduzindo os danos pelo choque frio. O colesterol também é precursor dos hormônios esteroides, como a testosterona e o estrógeno, fundamentais para a espermatogênese e para a libido de machos equinos. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de óleo de soja na dieta de garanhões, quanto a composição corporal (espessura de gordura subcutânea) e parâmetros reprodutivos (volume testicular, libido e congelabilidade do sêmen). O experimento foi conduzido na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. Foram utilizados 4 garanhões saudáveis e em atividade reprodutiva. Previamente à suplementação, os animais foram submetidos à avaliação da mensuração da espessura de gordura subcutânea nas regiões lombar (P1), do músculo glúteo (P2) e da base da cauda (P3) por meio de ultrassonografia modo-B (ALOKA SSD-500), uma vez por semana, durante duas semanas. Também coletas seminais foram realizadas com o auxílio de vagina artificial modelo Botucatu<sup>®</sup> e manequim artificial, após estimulação dos animais com uma égua em cio. No momento da coleta seminal foram coletados os dados para avaliação da libido (desejo sexual) dos garanhões. Para tal, todas as ações dos garanhões, desde a exposição a égua até a ejaculação, foram cronometrados, sendo estes: a) tempo de reação - tempo que o animal leva para manifestar interesse após ser exposto à égua; b) exposição peniana - tempo levado para que o pênis seja exposto; c) ereção - tempo levado para que o pênis entrasse em ereção completa; d) número de montas executadas pelo garanhão no manequim; e) tempo para monta: tempo decorrido até a primeira monta no manequim; f) ejaculação: tempo decorrido até a ejaculação; g) descida: tempo decorrido até a descida do manequim. As coletas foram mantidas duas vezes por semana durante duas semanas consecutivas; um dos ejaculados foi utilizado para o processo de criopreservação em cada semana. A avaliação do volume testicular foi realizada a partir da biometria testicular com uso de paquímetro, também duas vezes por semana. Após este período, foi incluído diariamente 168,5 ml (1400 kcal) de óleo de soja na dieta dos animais durante 10 semanas e as avaliações foram mantidas duas vezes por semana até o término do estudo. Os parâmetros percentagens de espermatozoides com motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) e velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ) do sêmen congelado foram avaliados pelo software CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) após descongelamento das palhetas à 37° C por um minuto em banho-Maria. Os resultados foram analisados mediante software SAS<sup>®</sup>, utilizando o modelo linear PROC GLM (procedure for general linear models), adotando o nível de significância de 5%. Para as variáveis referentes ao parâmetros de cinética espermática, libido e volume testicular não houve diferença significativa entre os períodos pré e pós-adição dietética de óleo. Já em todos os três pontos de avaliação de gordura subcutânea houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) antes da suplementação (P1:  $0,65 \pm 0,03$ ; P2:  $1,07 \pm 0,05$ ; P3:  $0,94 \pm 0,04$ ) e após a suplementação com óleo de soja (P1:  $0,8 \pm 0,01$ ; P2:  $1,49 \pm 0,06$ ; P3:  $1,23 \pm 0,05$ ). Os resultados sugerem o aumento da camada de gordura subcutânea em equinos com a adição dietética de óleo de soja, no entanto não indicaram uma mudança nos parâmetros reprodutivos quanto a congelabilidade de sêmen, libido e volume testicular. Sendo assim, a adição dietética de óleo de soja em garanhões proporcionou aumento de gordura subcutânea que pode refletir melhoria da condição corporal, mas nas condições do estudo não surtiu efeito sobre a qualidade do sêmen criopreservado, sobre a libido e sobre o volume testicular destes reprodutores. Mais estudos dose-resposta e tempo-resposta são necessários para melhor avaliar o efeito do óleo de soja nos parâmetros reprodutivos de garanhões.

**Palavras-chave:** suplementação, sêmen, testículo, libido, gordura subcutânea.

## Effect of dietary addition of soybean oil on body composition and reproduction of stallions

Luiza Vitarelli Kladt<sup>1</sup>, Cristian Silva Teixeira<sup>2</sup>, Ytalo Galinari Henriques Schuartz<sup>1</sup>, Ícaro Artuso Lage<sup>1</sup>,  
Hermano Monteiro de Barros Pereira<sup>2</sup>, Caroline Bittencourt de Sá<sup>2</sup>, Patrícia Reis de Moraes<sup>2</sup>, Yame Fabres  
Robaina Sancler-Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Veterinária – Universidade Federal de Viçosa; <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa  
\*E-mail: luiza.kladt@ufv.br

The use of supplements in the equine diet is a growing practice in horse breeding, and the use of vegetable oils is one of the supplementation alternatives. Vegetable oils are natural substances derived from seeds that in their composition present the union between one molecule of glycerol and three molecules of fatty acids. The use of vegetable oils in equine diets is as an energetic complement to carbohydrates, since they are readily available sources of energy for consumption. In addition, the cholesterol present has a fundamental role in the stability of the phospholipid bilayer of sperm cells, reducing damage by cold shock. Cholesterol is also a precursor of steroid hormones, such as testosterone and estrogen, which are fundamental for spermatogenesis and libido in equine males. In this sense, the objective of the present study was to evaluate the effects of soybean oil inclusion in the diet of stallions on body composition (subcutaneous fat thickness) and reproductive parameters (testicular volume, libido and frozen semen). The experiment was conducted at the Unit of Teaching, Research and Extension in Equid Science, Department of Animal Science, Federal University of Viçosa. Four healthy stallions in sexual active were used. Before supplementation, the animals were submitted to subcutaneous fat thickness measurement in the loin (P1), gluteus muscle (P2) and tail base (P3) regions by B-mode ultrasonography (ALOKA SSD-500) once a week for two weeks. Seminal collections were also performed with the aid of an artificial vagina Botucatu<sup>®</sup> model and a phantom, after stimulation by a mare in estrus. At the time of seminal collection, data were collected to evaluate the stallions' libido (sexual desire). So, all the stallions' actions from exposure to the mare until reaching the ejaculation were timed, as follows: a) reaction time - time taken for the animal to show interest after being exposed to the mare; b) penile exposure - time taken for the penis to be exposed; c) erection - time taken for the penis to become fully erect; d) number of mounts performed by the stallion on the phantom; e) time to mount: time taken until the first mount on the phantom; f) ejaculation: time taken until ejaculation; g) descent: time taken until the phantom descended. The collections were kept twice a week for two consecutive weeks; one of the ejaculates was used for the cryopreservation process once a week. Testicular volume evaluation was performed from testicular biometry using a testicle caliper, also twice a week. After this period, 168.5 ml (1400 kcal) of soybean oil was included daily in the animals' diet for 10 weeks and the evaluations were maintained twice a week until the end of the study. The sperm parameters such as total motility (MT, %), progressive motility (MP, %), progressive velocity (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), curvilinear velocity (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ) and path velocity (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ) of frozen semen were evaluated by CASA software (Computer-Assisted Sperm Analysis) after thawing the straws at 37° C for one minute in a water bath. The results were analyzed by SAS<sup>®</sup> software, using the PROC GLM (procedure for general linear models) linear model, considering 5% significance level. For the variables referring to sperm kinetic parameters, libido and testicular volume there were no significant difference between the pre- and post-dietary oil addition periods. In all three points of subcutaneous fat evaluation there were statistical difference ( $p < 0.05$ ) before supplementation (P1:  $0.65 \pm 0.03$ ; P2:  $1.07 \pm 0.05$ ; P3:  $0.94 \pm 0.04$ ) and after soybean oil supplementation (P1:  $0.8 \pm 0.01$ ; P2:  $1.49 \pm 0.06$ ; P3:  $1.23 \pm 0.05$ ). The results suggest an increase in subcutaneous fat layer in horses with the dietary addition of soybean oil, but did not indicate a change in reproductive parameters such as semen freezability, libido and testicular volume. Thus, the dietary addition of soybean oil in stallions provided increased subcutaneous fat that may reflect improved body condition, but under the conditions of the study showed no effect on the quality of cryopreserved semen, on libido and on testicular volume of these stallions. More dose-response and time-response studies are needed to better evaluate the effect of soybean oil on reproductive parameters in stallions.

**Keywords:** supplementation, semen, testicle, libido, subcutaneous fat.

## Existem diferenças entre as características da motilidade espermática (CASA) durante as etapas do processo de congelação do sêmen equino?

Carla Patricia Teodoro de Carvalho<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>2</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>3</sup>, Renata Lançoni<sup>1</sup>, Gabriela Bertaiolli Zoca<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia Oliveiros<sup>2</sup>, Gabriel De Carli dos Santos<sup>1</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes Arruda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia - LBSA, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>2</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – LEPPaR, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>3</sup>Laboratório de Fisiologia e Endocrinologia Molecular - LFEM, Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brasil

\*E-mail: arrudarp@usp.br

O sucesso da congelação de sêmen depende de fatores envolvidos nas diversas etapas do processo de criopreservação, como diluição seminal, a escolha dos crioprotetores, as curvas de refrigeração e congelação, *supercooling*, descongelação, dentre outras. Essas etapas irão determinar se a qualidade espermática será preservada ou se ocasionará danos irreparáveis à estrutura e fisiologia desta célula. O presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos de diferentes etapas do processo de congelação, incluindo etapa de refrigeração (diluído até 5°C), etapa inicial de congelação (5°C até -55°C) e etapa final de congelação (-55°C até descongelação) em espermatozoide equino sobre as características de motilidade espermática avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade espermática - CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Foram colhidos seis ejaculados de quatro garanhões (n=24). Cada ejaculado foi filtrado, diluído, centrifugado e ressuspensionado a  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL em diluidor de congelação (Botucurio<sup>®</sup>, Botupharma, Brasil) e envasado em palhetas de 0.5 mL. Em seguida, as palhetas de sêmen foram colocadas em máquina de congelação (TK 3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia de Congelação, Brasil) e refrigeradas da temperatura ambiente ( $\pm 22^\circ\text{C}$ ) até 5°C, com curva de refrigeração de  $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ . Em seguida, de 5°C a  $-120^\circ\text{C}$ , as palhetas foram congeladas com uma curva de congelação de  $-33^\circ\text{C}/\text{min}$ . Ao atingir  $-120^\circ\text{C}$ , foram imersas em nitrogênio líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ). As avaliações foram realizadas no sêmen diluído, 5°C,  $-55^\circ\text{C}$  e pós-descongelação quanto as seguintes características: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e células rápidas (RAP, %). Os resultados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados usando o *software* SAS. Os dados de cada avaliação de sêmen foram usados para calcular a proporção (%) de mudanças (redução ou aumento) das variáveis dos espermatozoides entre cada etapa de congelação. Para isto foi utilizada a seguinte fórmula:  $\text{Proporção de mudança (\%)} = (\text{valor obtido no tempo B} / \text{valor obtido no tempo A} \times [100] - 100)$ , sendo o momento A o início de cada etapa e o momento B sendo o final de cada etapa. Comparações envolvendo mais de uma média foram realizadas pelo teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa entre as variáveis testadas quando  $P < 0,05$ . Houve efeito de etapas ( $P < 0,05$ ) para todas as características estudadas. Os resultados obtidos para as etapas de refrigeração, etapa inicial de congelação e etapa final de congelação foram respectivamente: MT (-7,1%; -19,1% e -28,0%), MP (-6,3%; -3,0% e -16,1%), VAP (-7,7%, -11,9% e -8,2%), VSL (-6,9%, -3,2% e -2,9%), VCL (-9,7%, -9,1% e -7,2%), ALH (-8,5%, 4,4% e -2,0%), BCF (-9,7%, 5,5% e 3,5%), STR (2,6%, 7,8% e 4,9%), LIN (2,8%, 6,9% e 4,1%) e RAP (-1,5%, -23,9% e -32,4%). Houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) para as características de motilidade estudadas durante todo o processo de congelação, bem como, diferenças entre animais. Este estudo indica que uma determinada característica da motilidade sofre mudanças dentro de cada etapa do processo de congelação, o que pode sugerir novos estudos visando melhorar a congelabilidade do sêmen equino.

**Agradecimentos:** CAPES pelas bolsas de pós-graduação.

**Palavras-Chave:** Motilidade. Espermatozoide. Equino. Congelação. Etapas do processo de congelação.

## Are there differences between the characteristics of sperm motility (CASA) during the stages of the equine semen freezing process?

Carla Patricia Teodoro de Carvalho<sup>1</sup>, Eneiva Carla Carvalho Celeghini<sup>2</sup>, Guilherme Pugliesi<sup>3</sup>, Renata Lançoni<sup>1</sup>, Gabriela Bertaiolli Zoca<sup>1</sup>, Laura Nataly Garcia Oliveiros<sup>2</sup>, Gabriel De Carli dos Santos<sup>1</sup>, Alessandra Regina Carrer<sup>1</sup>, Rubens Paes Arruda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Semen Biotechnology and Andrology Laboratory - LBSA, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>2</sup>Laboratory of Teaching and Research in Reproductive Pathology – LEPPaR, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil; <sup>3</sup>Laboratory of Molecular Physiology and Endocrinology - LFEM, Department of Animal Reproduction, University of São Paulo – USP, FMVZ, Pirassununga, SP, Brazil.

\*E-mail: arrudarp@usp.br

The success of semen freezing depends on factors involved in the different stages of the cryopreservation process, such as seminal dilution, choice of cryoprotectants, cooling and freezing curves, supercooling, thawing, among others. These steps will determine whether sperm quality will be preserved or whether it will cause irreparable damage to the structure and physiology of this cell. The present study aimed to verify the effects of different stages of the freezing process, including the cooling stage (diluted to 5°C), initial freezing stage (5°C to -55°C) and final freezing stage (-55°C to thawing) in equine spermatozoa on sperm motility characteristics evaluated by the computerized sperm motility system - CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*). Six ejaculates were collected from four stallions (n=24). Each ejaculate was filtered, diluted, centrifuged and resuspended at 200 x 10<sup>6</sup> spermatozoa/mL in freezing extender (Botucio<sup>®</sup>, Botupharma, Brazil) and packaged in 0.5 mL straws. After, the straws were placed in a freezing machine (TK 3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia de Congelação, Brazil) and cooled from room temperature (± 22°C) to 5°C, with a cooling curve of -0.25°C/min. Then, from 5°C to -120°C, the straws were frozen with a freezing curve of -33°C/min. Upon reaching -120°C, they were immersed in liquid nitrogen (-196°C). Evaluations were performed in diluted semen, at 5°C, -55°C and post-thawing for the following characteristics: total motility (MT, %), progressive motility (MP, %), path velocity (VAP, µm/s), progressive velocity (VSL, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), head lateral displacement amplitude (ALH, µm), beat frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %), linearity (LIN, %) and rapid cells (RAP, %). The results obtained from the experimental procedures were analyzed using *SAS software*. Data from each semen assessment were used to calculate the proportion (%) of changes (decrease or increase) in sperm variables between each freezing stage. For this, the following formula was used: Proportion of change (%) = (value obtained at B time/value obtained at A time x [100] - 100), considering A time the beginning of each stage and B time being the end of each stage. To calculate the proportion of changes observed for each semen characteristic, the following formula was used: Proportion of change (%) = (value obtained at B time/value obtained at A time x [100] - 100), considering A time the beginning of each stage and B time being the end of each stage. Comparisons involving more than one mean were performed using the *Tukey test*. A significant difference was considered between the variables tested when P<0.05. There was a stage effect (P<0.05) for all characteristics studied. The results obtained for the cooling stage, initial freezing stage and final freezing stage were respectively: MT (-7.1%; -19.1% and -28.0%), MP (-6.3%; -3.0% and -16.1%), VAP (-7.7%, -11.9% and -8.2%), VSL (-6.9%, -3.2% and -2.9%), VCL (-9.7%, -9.1% and -7.2%), ALH (-8.5%, 4.4% and -2.0%), BCF (-9.7%, 5.5% and 3.5%), STR (2.6%, 7.8% and 4.9%), LIN (2.8%, 6.9% and 4.1%) and RAP (-1.5%, -23.9% and -32.4%). There were significant differences (P<0.05) for the motility characteristics studied throughout the freezing process, as well as differences between animals. This study indicates that a certain motility characteristic undergoes changes within each stage of the freezing process, which may suggest further studies to improve the freezeability of equine semen.

**Acknowledgments:** CAPES for the postgraduate scholarships.

**Keywords:** Motility. Sperm. Equine. Freezing. Stages of the freezing process.

## Indução Farmacológica da Ejaculação em Garanhão

Jardel Carvalho da Silva<sup>1</sup>, Raí Damasceno Eleamen<sup>1</sup>, Romulo Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Samara Cristina Costa Pinto<sup>2</sup>, Rafael Augusto Satrapa<sup>1</sup>, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes<sup>3</sup>, Jair Perez Osório<sup>4</sup>, Vanessa Balan Julio<sup>5</sup>; Luciane Maria Laskoski<sup>5</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – UFAC, Rio Branco, AC, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – USP/FMVZ, SP, Brasil, <sup>3</sup>UFTO, TO, Brasil, <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR, PR, Brasil; <sup>5</sup>Curso de Medicina Veterinária – UFPR, PR, Brasil.

\*E-mail: fernando.andrade@ufpr.br

A indução da ejaculação através da administração de fármacos tem se tornado uma alternativa viável, sendo de extrema importância para a coleta e preservação do sêmen de garanhões impossibilitados de ejacular pelos métodos tradicionais. Desta maneira, objetivou-se com esse trabalho relatar a coleta seminal, por via farmacológica, em um garanhão quarto de milha que apresentava dificuldade em executar a monta natural. Para isto, utilizaram-se cloridrato de imipramina (3 mg/kg; VO), cloridrato de detomidina a 1% (0,02 mg/kg; IV) e ocitocina (20 UI; IV). Forneceu-se a imipramina 2 horas antes da administração da detomidina, sendo a ocitocina aplicada conjuntamente ao sedativo. Foram realizadas três tentativas de coleta com intervalo de quatro dias, sendo que na primeira, após 1 hora de espera, o animal não ejaculou. Repetiu-se o ensaio quatro dias depois, não havendo resposta positiva. Desta maneira, optou-se por reformular o manejo de coleta, colocando-se uma égua próxima ao garanhão. O estímulo visual resultou em sucesso, havendo ejaculação em menos de 4 minutos após a administração da ocitocina. O ejaculado foi classificado como bom, tendo 80% de motilidade espermática total, vigor espermático 4, concentração espermática de  $250 \times 10^6$  spz/mL e volume total do ejaculado de 30 mL. Este sêmen foi criopreservado, tendo motilidade, pós-congelamento, de 60%. A literatura traz respostas variadas quanto ao êxito da coleta seminal em garanhões pelo uso de fármacos, o que foi confirmado no presente estudo, havendo resposta positiva somente na terceira tentativa e com estímulo visual ao garanhão. Desta maneira, frente ao manejo aqui empregado, indica-se o uso de égua junto ao garanhão, para se realizar a indução da ejaculação por meio farmacológico.

**Palavras-chave:** ocitocina, imipramida, quarto de milha.

## Pharmacological Induction of Ejaculation in Stallion

**Jardel Carvalho da Silva<sup>1</sup>, Raí Damasceno Eleamen<sup>1</sup>, Romulo Silva de Oliveira<sup>1</sup>, Samara Cristina Costa Pinto<sup>2</sup>, Rafael Augusto Satrapa<sup>1</sup>, Márcio Gianordoli Teixeira Gomes<sup>3</sup>, Jair Perez Osório<sup>4</sup>, Vanessa Balan Julio<sup>5</sup>; Luciane Maria Laskoski<sup>5</sup>, Fernando Andrade Souza<sup>5\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental – UFAC, Rio Branco, AC, Brasil;

<sup>2</sup>Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução – USP/FMVZ, SP, Brasil, <sup>3</sup>UFTO, TO, Brasil, <sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UFPR, PR, Brasil; <sup>5</sup>Curso de Medicina Veterinária – UFPR, PR, Brasil

\*E-mail: fernando.andrade@ufpr.br

The induction of ejaculation through drug administration has become a viable alternative, being extremely important for the collection and preservation of semen from stallions unable to ejaculate by traditional methods. In this way, the objective of this work was to report the seminal collection, by pharmacological route, in a quarter horse stallion that had difficulty in performing the natural mating. For this, imipramine hydrochloride (3 mg/kg; VO), 1% detomidine hydrochloride (0.02 mg/kg; IV) and oxytocin (20 IU; IV) were used. Imipramine was given 2 hours before detomidine administration, and oxytocin was applied together with the sedative. Three collection attempts were performed with an interval of four days, and in the first one, after 1 hour of waiting, the animal did not ejaculate. The test was repeated four days later, with no positive response. In this way, it was decided to reformulate the collection management, placing a mare next to the stallion. Visual stimulation resulted in success, with ejaculation occurring less than 4 minutes after oxytocin administration. The ejaculate was classified as good, having 80% total sperm motility, spermatic vigor 4, sperm concentration of  $250 \times 10^6$  spz/mL and total ejaculate volume of 30 mL. This semen was cryopreserved, having a post-freezing motility of 60%. The literature brings varied answers regarding the success of seminal collection in stallions using drugs, which was confirmed in the present study, with a positive response only on the third attempt and with visual stimulation to the stallion. Thus, in view of the management used here, the use of a mare with the stallion is indicated to carry out the induction of ejaculation by pharmacological means.

**Keywords:** oxytocin, imipramide, quarter horse.

## Uso de BWW modificado para refrigeração de sêmen equino

William Morais Machado<sup>1</sup>, Thalita Marques Brito<sup>1</sup>, Larissa Rodrigues de Santana<sup>1</sup>, Maíra Guimarães Kersul<sup>1</sup>,  
Diego Passos Guimarães<sup>1</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Ilhéus-Bahia, Brasil

\*E-mail: paolasnoeck@uesc.br

Os diluidores seminais utilizados nos processos de conservação do sêmen em baixas temperaturas têm como principal objetivo proteger e minimizar os danos espermáticos, principalmente os decorrentes do choque frio. Uma das formas de evitar o choque térmico é pela adição de fontes de macromoléculas nas formulações diluidoras, as mais usuais são a gema de ovo, o leite e seus derivados. Uma desvantagem desses componentes de origem animal é o risco sanitário, além de resultar em diluidores sem padronização química. A busca pela padronização dos diluidores seminais acabou induzindo muitas pesquisas em formulações quimicamente definidas, como o meio descrito por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW), capaz de preservar o sêmen equino por vários dias em temperatura ambiente. Este diluidor não foi desenvolvido para preservar os espermatozoides nas temperaturas usuais de refrigeração, no entanto, sua formulação oferece componentes importantes para manutenção do metabolismo espermático. Objetivou-se utilizar o meio quimicamente definido BWW para refrigerar a 15 °C o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador e investigar a influência da adição do ácido docosa-hexaenoico (DHA), da rosiglitazona (ROSI) e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e suas associações sobre os parâmetros espermáticos. Um total de nove ejaculados obtidos de três garanhões foram coletados por meio de vagina artificial, o sêmen foi diluído para obtenção de  $25 \times 10^6$  espermatozoides / mL nos diferentes diluidores, formando os seguintes grupos experimentais: D1) BotuSêmen<sup>®</sup>; D2) BWW; D3) BWW + 30ng/mL<sup>-1</sup> de DHA + 50 µM de ROSI; D4) BWW + 50 µM de ROSI; D5) BWW + 30ng/mL<sup>-1</sup> de DHA; D6) BWW + 10% de LDL + 30ng/mL<sup>-1</sup> de DHA + 50 µM de ROSI; D7) BWW + 10% de LDL + 30ng/mL<sup>-1</sup> de DHA; D8) BWW + 10% de LDL + 50 µM de ROSI; D9) BWW + 10% de LDL. As amostras diluídas foram submetidas à refrigeração em caixa BotuFlex<sup>®</sup> até atingir a temperatura de 15 °C, quando foram transferidas e mantidas na mesma temperatura por até 24 horas em refrigeradora MiniTube<sup>®</sup>. Para avaliar o efeito dos diluidores sobre os espermatozoides foram estudados os parâmetros de cinemática espermática pelo SCA Evolution<sup>®</sup>; a integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST) utilizando solução de sacarose a 100 mOsm/L; a integridade estrutural das membranas por meio das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP); a integridade da cromatina espermática utilizando a técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina e a atividade mitocondrial por meio da coloração de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Os dados foram submetidos Análise de Variância e teste de Tukey para testar as diferenças entre os diluidores. Todas as análises foram feitas utilizando o software SPSS, com nível de significância de 5%. Os meios BWW modificados foram capazes de manter a motilidade total igualmente ao controle ( $P > 0,05$ ) exceto o com adição somente de LDL (D9;  $P < 0,05$ ). Os diluidores BWW com DHA + ROSI e BWW + ROSI preservaram o percentual de progressivamente móveis semelhante ao BotuSêmen<sup>®</sup> ( $P > 0,05$ ). Os diluidores BWW contendo LDL, LDL + ROSI e associação de LDL + DHA + ROSI foram inferiores ao BotuSêmen<sup>®</sup> para preservar parâmetros cinemáticos importantes como a VCL, VAP e BCF (D6, D8 e D9;  $P < 0,05$ ). Além disso, a ALH dos espermatozoides refrigerados em BWW + LDL e BWW + LDL + ROSI também estava menor quando comparado com as células diluídas no meio controle ( $P < 0,05$ ). Os parâmetros de linearidade e retilinearidade não diferiram entre as amostras refrigeradas nos diluidores testados ( $P > 0,05$ ). Todos os diluidores testados preservaram de forma semelhante parâmetros de viabilidade espermática importantes como: a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, a atividade mitocondrial e a integridade do DNA depois de avaliada a compactação da cromatina. Concluímos que os diluidores quimicamente definidos testados no presente estudo podem ser uma alternativa segura em substituição ao BotuSêmen<sup>®</sup> para refrigerar o sêmen de garanhões a 15° C por 24 horas, no entanto, ressaltamos que a adição de LDL na concentração estudada não foi interessante para preservar parâmetros cinemáticos importantes para a fertilidade.

**Palavras-chave:** Refrigeração, BWW, DHA, rosiglitazona, LDL.

## Use of modified BWW for cooling equine semen

William Morais Machado<sup>1</sup>, Thalita Marques Brito<sup>1</sup>, Larissa Rodrigues de Santana<sup>1</sup>, Máira Guimarães Kersul<sup>1</sup>,  
Diego Passos Guimarães<sup>1</sup>, Paola Pereira das Neves Snoeck<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC),  
Ilhéus-Bahia, Brasil

\*E-mail: paolasnoeck@uesc.br

The seminal extenders used in the processes of semen conservation at low temperatures are intended to protect and minimize sperm damage, especially those resulting from cold shock. One of the ways to avoid thermal shock is by adding sources of macromolecules in the extenders formulations, the most common being egg yolk, milk and its derivatives. The disadvantage of these components of animal origin is health risk, in addition, an extender without chemical standardization. Searching for the standardization of seminal extenders ended up in a lot of research on chemically defined formulations, such as the medium described by Biggers, Whitten and Whittingham (BWW), capable of preserving equine semen for several days at room temperature. This extender was not developed to preserve sperm at the usual cooling temperature; however, its formulation offers important components for the maintenance of sperm metabolism. The aim of this work was to use the chemically defined BWW medium for cooling semen of Mangalarga Marchador stallions at 15 °C and investigate the influence of the addition of docosahexaenoic acid (DHA), rosiglitazone (ROSI) and low density lipoproteins (LDL) and their associations on sperm. A total of nine ejaculates obtained from three stallions were collected through an artificial vagina, the semen was diluted to obtain  $25 \times 10^6$  sperm / mL in different extenders, forming the following experimental groups: D1) BotuSemen<sup>®</sup>; D2) BWW; D3) BWW +  $30\text{ng/mL}^{-1}$  of DHA +  $50 \mu\text{M}$  of ROSI; D4) BWW +  $50 \mu\text{M}$  ROSI; D5) BWW +  $30\text{ng/ml}^{-1}$  DHA; D6) BWW + 10% LDL +  $30\text{ng/mL}^{-1}$  DHA +  $50 \mu\text{M}$  ROSI; D7) BWW + 10% LDL +  $30\text{ng/ml}^{-1}$  DHA; D8) BWW + 10% LDL +  $50 \mu\text{M}$  ROSI; D9) BWW + 10% LDL. The extended samples were submitted to cooling in a BotuFlex<sup>®</sup> box until reaching a temperature of 15 °C, when they were transferred and kept at the same temperature for up to 24 hours in a MiniTube<sup>®</sup> cold room refrigerator. To evaluate the effect of extenders on sperm, kinematics parameters were studied by SCA Evolution<sup>®</sup>; the functional integrity of the plasma membrane by the hypoosmotic test (HOST) using sucrose solution at 100 mOsmol/L; the structural integrity of the membranes through the fluorescent probes carboxyfluorescein diacetate (CFDA) and propidium iodide (IP); sperm chromatin integrity using the toluidine blue-induced by metachromasia technique and mitochondrial activity using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. Data were submitted to Analysis of Variance and Tukey's test to test the differences between experimental groups. All analyzes were performed using SPSS software, with a significance level of 5%. The modified BWW extenders were able to maintain total motility as well as the control ( $P > 0.05$ ), except with the addition of LDL (D9;  $P < 0.05$ ). The BWW extenders with DHA + ROSI and BWW + ROSI preserved the percentage of progressive motility similar to BotuSemen<sup>®</sup> ( $P > 0.05$ ). BWW extenders containing LDL, LDL + ROSI and the association of LDL + DHA + ROSI were inferior to BotuSemen<sup>®</sup> to preserve important kinematic parameters such as VCL, VAP and BCF (D6, D8 and D9;  $P < 0.05$ ). In addition, the ALH of sperm cooled in BWW + LDL and BWW + LDL + ROSI was also lower when compared to sperms diluted in the control medium ( $P < 0.05$ ). The linearity and straightness parameters did not differ between samples diluted after cooling ( $P > 0.05$ ). All extenders tested preserved important sperm viability parameters such as: functional and structural integrity of the plasma membrane, mitochondrial activity and DNA integrity ( $P > 0.05$ ). We conclude that the chemically defined extenders tested in the present study can be a safe alternative to BotuSemen<sup>®</sup> for cooling stallion semen at 15° C for 24 hours, however, we emphasize that the addition of LDL interferes with important kinematic parameters for fertility.

**Keywords:** Cooling, BWW, DHA, rosiglitazone, LDL.