

**UNIVERSIDADE BRASIL**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *stricto sensu* PROFISSIONAL EM  
PRODUÇÃO ANIMAL  
CAMPUS DESCALVADO - SP**

**GIZELE MONSUETH MELO**

**AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES  
SUPLEMENTADOS COM ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS NATURAIS**

**EVALUATION OF FRESH AND CRYO-PRESERVED SEMEN FROM  
STALLIONS SUPPLEMENTED WITH ANTIOXIDANTS AND NATURAL  
COMPOUNDS**

Descalvado – SP/2023

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM PRODUÇÃO  
ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES  
SUPLEMENTADOS COM ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS NATURAIS**

**GIZELE MONSUETH MELO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Animal da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi  
**Orientadora**

DESCALVADO – SP  
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,  
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M485a MELO, Gizele Monsueth.

Avaliação do sêmen fresco e criopreservado de garanhões suplementados com antioxidantes e compostos naturais / Gizele Monsueth Melo – Descalvado: Universidade Brasil, 2023.  
68 f.: il. color.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Produção Animal da Universidade Brasil.  
Orientação: Profa. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi.

1. Ejaculado. 2. Equino. 3. Congelação. 4. L-carnitina. I. Orlandi, Cássia Maria Barroso. II. Título.

CDD 636.0824



UNIVERSIDADE  
BRASIL

TERMO DE APROVAÇÃO

GIZELE MONSUETH MELO

"AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO E CONGELADO DE GARANHÕES  
SUPLEMENTADOS COM ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS NATURAIS"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Mestrado em Produção Animal da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi (presidente-orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Cynthia Pieri Zeferino (UNIVERSIDADE BRASIL)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Cely Marini Melo Onã (UFMT)

Descalvado/SP, 31 de agosto de 2023  
Presidente da Banca Prof. Dra. Cássia Maria Barroso Orlandi

Houve alteração do Título: sim ( ) não (X)

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



UNIVERSIDADE  
BRASIL

### Termo de Autorização

**Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES**

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: "AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO E CONGELADO DE GARANHÕES SUPLEMENTADOS COM ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS NATURAIS"

Houve alteração do Título: sim ( ) não (X)

Autor(es):

Discente: **Gizele Monsueth Mejo**

Assinatura: \_\_\_\_\_

Orientador(a): **Profª. Dra. Cássia Maria Barroso Oriandi**

Assinatura: \_\_\_\_\_

Coorientador(a):

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: 31/08/2023

## DEDICATÓRIA

- A doutora Cássia Maria Barroso Orlandi, por ter sido minha orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade. Aos meus pais Deija, Nilson (*inmemoria*) e irmãos, Meriele e Henrique que sempre incentivaram.

*Consagre ao Senhor tudo que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.*

*(Provérbios 16:3)*

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, pela minha vida, e por me permitir alcançar todas as conquistas durante a jornada acadêmica e a Cássia Maria Barroso Orlandi por estar nessa jornada comigo.

## **AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES SUPLEMENTADOS COM ANTIOXIDANTES E COMPOSTOS NATURAIS**

### **RESUMO**

A criopreservação do sêmen antes do período de monta natural pode otimizar o uso de biotecnologias na estação reprodutiva. No entanto, os garanhões podem se beneficiar da suplementação com antioxidantes e compostos naturais, principalmente fora da estação. Para tanto, a dieta de quatro garanhões da raça Quarto de Milha foi acrescida da suplementação durante 75 dias com produto comercial: ácido fólico, beta caroteno, L-carnitina, linhaça integral moída, vitamina C e vitamina E. O período experimental teve início com coletas de sêmen para nivelamento biológico basal, seguidas de coletas para processamento e criopreservação dos ejaculados (fase 1). Após a fase 1, iniciou-se a suplementação e ao término da mesma, prosseguiram-se novamente as coletas de nivelamento basal (n= 6 coletas x 4 = 24) e coletas para processamento e criopreservação (n=24) sucessivamente. Embora, total de 96 ejaculados foram obtidos no estudo, apenas 24 pré- supl. e 24 pós- supl. foram criopreservados e comparados pós descongelação. Variáveis do sêmen fresco foram analisadas imediatamente pós coleta e submetidas à representação por box plot, sem diferenças significativas. Após a descongelação das palhetas, processadas nos respectivos momentos pré e pós suplementação, o sêmen foi submetido à avaliação da cinética CASA (análise espermática computadorizada). Outras variáveis envolvendo integridade de membrana plasmática por fluorescência e morfologia por contraste de fase foram determinadas, embora não apresentaram diferenças significativas. Dados do sêmen criopreservado foram submetidos ao PROC MIX, SAS; revelando diferenças significativas quanto às variáveis da cinética CASA: motilidade, velocidade e amplitude de movimento (superiores para o momento pré versus pós supl) e linearidade, retilinearidade (superiores para o momento pós versus pré supl).

**Palavras-chave:** ejaculado, equino, congelação e L- carnitina

# EVALUATION OF FRESH AND CRYO-PRESERVED SEMEN FROM STALLIONS SUPPLEMENTED WITH ANTIOXIDANTS AND NATURAL COMPOUNDS

## ABSTRACT

Sêmen cryopreservation before the period of natural mounting can optimize the use of biotechnology during the reproductive period. However, stallions can be improved as far as supplementation (supp) with antioxidants and natural compounds, a specialty out of the reproductive season. Thus, the diet of four Quarter Horse Stallions was supplemented during 75 days by a commercial product: folic acid, Beta Carotene, L- Carnitine, milled whole flaxseed, Vitamin C and E. Experimental period initiated with sêmen being collected for basal biological leveling (exhaustion of sperm reserves), followed by sêmen collection for criopreservation (phase 1). After this period, the supp was initiated and at its finalization, a new phase was performed by basal biological leveling (n= 6 collection x 4= 24) and sêmen collection for criopreservation (n=24) successively. Despite the fact that 96 ejaculates were obtained, only 24 pre and post supp were cryopreserved and compared after thawing. Fresh sêmen variables were analyzed immediately after collection and submitted to Box Plot representation, without significant differences. After thawing sêmen straws, previously processes in respective moments pre and post supp, were then submitted to CASA (Computerized assisted sperm analysis) and kinetics variables were determined. Other variables as: sperm plasma membrane integrity were assessed by fluorescent probes and morphology by phase contrast microscopy, but no significant differences were found. Criopreserved sêmen data was submitted to PROC MIX, from SAS; and resulted in significant differences as far as variables from kinetics by CASA: motility, velocity, movement amplitude ( superior for pre vs post supp) and linear and rectilinear ( superior at post *versus* pre supp).

**Key words:** ejaculates, equine, freezing and L carnitine.

## **DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO**

O presente estudo proporcionou conhecimento a respeito de procedimentos envolvendo biotecnologias reprodutivas: criopreservação do sêmen equino dentro da rotina de uma central comercial. A avaliação do sêmen pós descongelação pelo método CASA, assim como sua avaliação *in loco*, após a coleta dos garanhões foi enriquecedora para a equipe de discentes da graduação e pós-graduação envolvidos. Além do exposto, aspectos relacionados à nutrição, ação antioxidante e demais efeitos, foram abordados durante a elaboração da dissertação, promovendo interação da discente de mestrado com temas fundamentais para a reprodução equina e, conseqüentemente, equinocultura, a qual ocupa lugar de relevância no quadro econômico do país e do mundo.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Esquema dos procedimentos envolvendo os períodos pré-suplementação, suplementação e pós- suplementação com antioxidantes e compostos naturais em garanhões da raça Quarto de Milha.....25

**Figura 2** - Concentração espermática (número de espermatozoides por mL x10<sup>6</sup> no ejaculado Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....32

**Figura 3** - Volume do ejaculado no momento Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....33.

**Figura 4** - Motilidade espermática Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....35.

**Figura 5** - Volume de gel do ejaculado no momento Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....  
...36

**Figura 6** - Concentração total no ejaculado (Número de espermatozoide x 10<sup>6</sup> / ML X Volume total do ejaculado).....37

**Figura 7** - Volume do ejaculado - Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação com compostos em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....  
....38.

**Figura 8** - Concentração do ejaculado Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....39

**Figura 9** - Motilidade espermática do ejaculado - Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....  
.40

**Figura 10** - Volume de gel do ejaculado no momento Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.....  
...41

**Figura 11** - EJACULADO TOTAL Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em  
garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação  
reprodutiva.....42

**Figura 12** - Volume Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça  
Quarto de Milha precedendo a estação  
reprodutiva.....43

**Figura 13** - Concentração Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões  
da raça Quarto de Milha precedendo a estação  
reprodutiva.....44

**Figura 14** - Volume Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça  
Quarto de Milha precedendo a estação  
reprodutiva.....45

**Figura 15** - Volume Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça  
Quarto de Milha precedendo a estação  
reprodutiva.....46

## LISTA DE TABELA

<b>TABELA 1</b> - Cinética, morfologia e integridade de membrana no sêmen criopreservado de garanhões da raça quarto de milha pré e pós suplementação com antioxidantes e compostos naturais antecedendo a estação reprodutiva.....	49
---	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
D0	Dia inicial
D3	Terceiro dia
D5	Quinto Dia
D8	Oitavo Dia
D9	Nono Dia
D17	Décimo Sétimo Dia
P	Pequeno
M	Médio
ALH	Amplitude Lateral da Cabeça
BCF	Frequência de Batimento Flagela Cruzado
G	Grande
LIN	Linearidade
STR	Retilínearidade
RAP	número de espermatozoides rápidos
VAP	Velocidade trajetória média
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade linear progressiva

WOB	Índice de oscilação
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis

<b>1 . INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVO GERAL</b>	<b>18</b>
2.1 Objetivo específico	18
<b>3 . REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>18</b>
3.1 Antioxidantes e compostos naturais na criopreservação do sêmen equino	18
3.2 Idade e sazonalidade nos parâmetros espermáticos em garanhões	20
<b>4. Materiais e Métodos</b>	<b>24</b>
4.1 Local	24
4.2 Animais	24
4.3 Suplementação	24
4.4 Coletas de sêmen	25
4.4.1 Cronograma experimental	25
4.4.2 Higienização, preparação e obtenção do ejaculado	26
4.5.1 Motilidade	27
4.5.2 Concentração	27
4.5.3 Volume do ejaculado e volume de gel	28
4.6 Criopreservação	28
4.7 Avaliação CASA	29
4.7.1 Cinética espermática	29
4.7.2 Integridade de membrana plasmática e morfologia espermática	31
4.8 Análise estatística	32
<b>5. Resultados e Discussão</b>	<b>32</b>
5.1 Sêmen fresco	32
5.1.1 Concentração	32
5.1.2 Volume	34
5.1.3 Motilidade	35
5.1.4 Volume de gel	36
5.1.5 Concentração total (Total do ejaculado)	38
5.2 sêmen fresco / Nivelamento Basal	39
5.2.1 Volume do ejaculado	39
5.2.2 Concentração do ejaculado	40
5.2.3 Motilidade	41
5.2.4 Volume do gel	42
5.2.5 Concentração total (Total do ejaculado)	43
5.3 Sêmen fresco / nivelamento basal / criopreservação do sêmen	44
5.3.1 Volume da concentração	45
5.3.2 Motilidade	47
5.3.3 Volume de gel	48
5.3.4 Concentração total (Total do ejaculado)	50
<b>5.4 SÊMEN CRIOPRESERVADO</b>	<b>51</b>
5.4.1 Resultados das avaliações do sêmen pós descongelação pelo CASA	51
5.4.2 Resultados das avaliações do sêmen pós descongelação - integridade de membrana plasmática (fluorescência) e morfologia espermática (contraste de fase).	54

5.5 Sazonalidade e profissionais condutores dos procedimentos de criopreservação do sêmen na fase 1 (pré- suplementação) e na fase 2 (pós suplementação). 56

5.6 “Garanhões “bons e ruins” quanto a congelabilidade 58

**CONCLUSÃO** 59

**CONSIDERAÇÕES FINAIS** 59

**REFERÊNCIAS** 60

## 1 . INTRODUÇÃO

A equinocultura no Brasil se destaca internacionalmente com crescimento expressivo nas últimas décadas e o agronegócio voltado ao cavalo gera empregos em diversas áreas. No Brasil, a indústria equina exerce importante participação na geração de renda para o PIB do agronegócio, chegando a movimentar R\$16,15 bilhões, gerando diretamente 610 mil empregos diretos e 2.430 indiretos (MAPA, 2019).

No Censo Agropecuário de 2021, o rebanho nacional de equinos era de 5.777.046 cabeças, assim distribuídos nas respectivas regiões geográficas: Norte (651.820 / 14,35%), Nordeste (1.172.854 / 25,82%), Sudeste (1.123.981 / 24,75%), Sul (754.686 / 16,62%) e Centro-Oeste (838.492 / 18,46%) (IBGE, 2021).

A produção de equídeos é expressiva e depende diretamente da utilização de biotecnologias da reprodução, as quais proporcionam a propagação de animais de genética selecionada, de acordo com o intuito da criação dos plantéis nas respectivas raças e funções, como: esporte, trabalho, lazer e inclusão social (equoterapia).

Neste sentido, a criopreservação do sêmen equino é uma ferramenta importante para a rotina das centrais reprodutivas, sendo esta técnica aplicada à inseminação artificial, transferência de embriões e injeção intracitoplasmática do espermatozoide (ICSI) e perspectivas para fertilização *in vitro* (FIV) equina (FELIX *et al*, 2022).

No entanto, a qualidade do sêmen a ser processado determina o sucesso das técnicas empregadas nas centrais, no que diz respeito à preservação, possibilitando o uso do mesmo em momentos favoráveis e convenientes, de acordo com as rotinas de serviços prestados durante a estação reprodutiva.

A qualidade do sêmen pode ser influenciada por fatores comportamentais, físicos, como status sanitário, aspectos relacionados ao ambiente e também pelo manejo nutricional dos garanhões.

Assim, o fornecimento de dietas suplementadas com substâncias capazes de melhorar a performance reprodutiva de machos domésticos vem sendo adotado em diversas espécies, com intuito de promover melhores condições para o processamento do sêmen e, conseqüentemente, garantir sua conservação para uso futuro.

Tais suplementos são normalmente de fonte oleosa ou peletizada e adicionados junto ao concentrado ou de forma oral direta. Dentre os suplementos, fontes de substâncias antioxidantes e compostos naturais são normalmente explorados com a finalidade de agir sistemicamente e chegar a uma ação celular específica influenciando na espermatogênese.

Diferentes antioxidantes vêm sendo utilizados na dieta de touros e garanhões, como a L-carnitina, a qual tem a função de influenciar o transporte de ácidos graxos de cadeia longa dentro das mitocôndrias para oxidação beta e fosfato rico em energia, otimizando a função mitocondrial e produção de energia, resultando em melhor motilidade e sobrevivência de espermatozoides pré e pós-congelamento (Arruda *et al*, 2010).

A necessidade de melhoria na performance reprodutiva de garanhões normalmente selecionados pelo seu desempenho esportivo é comum, uma vez que há diferenças raciais notórias na qualidade espermática. Tal fato está

relacionado a ausência de seleção em determinadas raças para o desempenho reprodutivo.

Em equinos, a produção espermática é caracterizada por um ciclo médio 57 dias (espermatogênese no cavalo) (AMANN, 1993), portanto a longevidade da suplementação deve corresponder ao período que possa influenciar no processo da espermatogênese (SENGER, 2003).

Normalmente as centrais realizam a criopreservação do sêmen equino também durante períodos fora da estação de monta natural, visando a praticidade para o uso do mesmo durante a estação de monta. Estudos apresentam resultados favoráveis quanto à qualidade espermática, mesmo quando os ejaculados são obtidos em períodos que antecedem a estação reprodutiva, ou nos períodos posteriores a mesma (AURICH et al., 2020).

Garanhões com qualidade espermática inferior quanto ao potencial de refrigeração e congelamento podem se beneficiar da suplementação dos compostos citados acima quando submetidos ao congelamento de sêmen.

Para tanto, a dieta de garanhões com antioxidantes e compostos naturais, os quais possam trazer resultados positivos para o espermatozoide é utilizada nas centrais, embora haja escassez de informações na literatura quanto a sua efetividade.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o sêmen de garanhões após o fornecimento da suplementação da dieta com antioxidantes e compostos naturais, assim como o desempenho da execução de criopreservação do sêmen após treinamento e aprendizado dentro de uma central privada.

### **2.1 Objetivo específico**

Avaliar os parâmetros espermáticos do sêmen fresco de garanhões pré e pós suplementação com antioxidantes e compostos naturais.

Avaliar os parâmetros de cinética espermática, por meio do CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), no sêmen criopreservado antes e após o uso de dieta com antioxidantes e compostos naturais precedendo a estação reprodutiva em garanhões da raça Quarto de Milha.

Descrever a capacidade de aprendizado da técnica pela discente e equipe, por meio dos resultados de criopreservação do sêmen no período pós suplementação, em uma central privada.

## **3 . REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Antioxidantes e compostos naturais na criopreservação do sêmen equino**

Os antioxidantes, em particular, possuem uma função intracelular importante devido a muitos compostos que possam promover alterações irreversíveis em biomoléculas como: ácidos graxos, DNA e enzimas. Portanto, as células têm a capacidade de produzir compostos antioxidantes que neutralizam a ação danosa desses produtos tóxicos. Tal ação antioxidante

pode ser obtida por meio de fontes alimentícias, as quais promovem um estado de saturação plasmática que impeça ou retarde o desenvolvimento de danos oxidativos (VIEIRA, 2003).

Diante da importância e viabilidade das células germinativas como o espermatozoide, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático (LUZ et al., 2011).

No caso do sistema enzimático, a ação dos mesmos pode ser caracterizada pela ativação de ácidos graxos de membrana. Neste caso eles são ativados nas membranas mitocondriais externas por esterificação com a Coenzima A, uma vez que a  $\beta$ -oxidação ocorre na matriz mitocondrial, o ácido graxo deve ser transportado através da membrana mitocondrial interna (MMI) por um transportador específico denominado carnitina (Agarwal & Said, 2004).

O composto L-Carnitina é sintetizada no fígado, rim e cérebro por meio da conversão dos aminoácidos essenciais lisina e metionina (HULSE et al., 1978; JEULIN et al., 1994). Esta atua no metabolismo do espermatozoide, fornecendo energia para motilidade, maturação e espermatogênese completa. Além disso, as carnitinas também exercem propriedades antioxidantes por meio da proteção contra a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), além de reparação (Agarwal & Said, 2004).

A L-carnitina tem como função, dentro do metabolismo do espermatozoide, prover a quantidade necessária de energia, favorecendo a motilidade, a qual é resultante de adequada maturação espermática e espermatogênese. Este composto age como modulador da oxidação dos ácidos graxos presentes nas mitocôndrias (Agarwal & Said, 2004).

No processo de geração de energia, a carnitina age com a acetiltransferases de cadeias longas que dependem do composto carnitina, sendo eles intitulados também como palmitotransferases (CPTI e CPTII), acetil-carnitina translocases (ARRUDA et al., 2010).

Além das carnitinas, outros elementos são essenciais para ação antioxidantes como determinadas vitaminas e seus precursores. Dentre elas destacam -se a vitamina E, C (na forma de ácido ascórbico) e precursores da vitamina A como o beta caroteno, descritos a seguir.

A vitamina E (γ -tocoferol) tem papel metabólico, ações antioxidantes, de modo que a degradação peroxidativa lipídica nas membranas das células e a origem de radicais livres resultantes desta degradação, afetam a estrutura celular, o que pode ser prevenido pela ação desta vitamina, além de otimizar a atividade de outros antioxidantes (YONEWAZA et al., 2015).

Os mesmos autores descrevem outros efeitos benéficos desta vitamina atuando na proteção dos lipídios de membrana eritrocitária, na qual ocorre reação da peroxidação, podendo ser preservada pela mesma (YONEWAZA et al., 2015).

A vitamina C, ou ácido ascórbico, age na interface extracelular quanto ao potencial antioxidativo, é hidrossolúvel, atuando na remoção dos radicais hidroxilo, superóxido e do peróxido de hidrogênio. Além do exposto, interações entre elementos caracterizam a ação desta vitamina, a qual age na reciclagem da vitamina E (KEFER et al., 2009).

Considerando os precursores das vitaminas, tem-se o beta-caroteno com papel fundamental na origem da vitamina A, lipossolúvel; além da atuação na produção de esteróides e ação antioxidante (BARTECHINI, 1997). Tal vitamina possui particularidades quanto à atuação fisiológica e é fundamental

no desempenho dos tecidos epiteliais, dos órgãos reprodutivos (ARIKAN & RODWAY, 2000).

Outro elemento como o ácido fólico, quando em associação às vitaminas e minerais, principalmente na forma de folato atuaram nos radicais livres e uma vez na presença de zinco e cobalaminas, potencializaram a ação metabólica dos mesmos (Barros, 2016).

Este elemento quando utilizado na forma oral em associação com selênio e zinco (micronutrientes), em homens, demonstrou alterações favoráveis quanto à morfologia espermática, no entanto, sem diferença na concentração e motilidade (MAIA et al., 2009). O autor faz uma reflexão sobre a mudança favorável na morfologia espermática, a qual resultaria em diminuição na quantidade de espécies reativas de oxigênio no sêmen, e consequente redução de danos nas células germinativas.

### **3.2 Idade e sazonalidade nos parâmetros espermáticos em garanhões**

As diferenças entre garanhões jovens e idosos foram relatadas, indicando que a motilidade espermática de garanhões até seis anos é inferior com relação aos garanhões acima desta faixa etária (GREISAR et al., 2020).

Outros autores citam que a capacidade de espermatogênese não é estabelecida antes de seis anos de idade e a motilidade do sêmen pós descongelamento foi descrita como inferior em garanhões até seis anos de idade comparados à garanhões adultos e maduros quanto à performance reprodutiva (DOWSETT & KNOTT, 1996).

Esta informação é relevante, na medida que indica as variações inerentes à idade, independente de estação ou de capacidade quanto à congelabilidade. Neste sentido, a homogeneidade da população estudada deve ser considerada quando os mesmos não são de faixa etária similar (GREISAR et al., 2020).

Além da idade, outros fatores como sazonalidade podem ou não interferir com a performance reprodutiva. Os aspectos relacionados com a variação da produção espermática e consequente influência da sazonalidade são abordados em inúmeros trabalhos, ainda apresentando controvérsias quanto aos efeitos destas variações, principalmente no plasma seminal e membrana espermática (AURICH, 2020).

Sob condições comerciais, o número de doses de sêmen criopreservado é de grande interesse, desde que a qualidade do sêmen pós descongelamento seja de aceitável qualidade. Dados preliminares de grupos de pesquisa indicam que a produção espermática no garanhão pode ser mais eficiente nos meses de verão (AURICH, 2016 & KUHL et al 2016).

O plasma seminal afeta a qualidade do sêmen criopreservado de garanhões (Aurich et al., 1996); as variações sazonais na composição do plasma pode então contribuir para a qualidade do sêmen processado por biotecnologias reprodutivas. Além disso, mudanças sazonais na composição do plasma seminal quanto membrana plasmática devem ser consideradas (AURICH et al 2018).

Outros autores relatam também o efeito da sazonalidade nos garanhões de acordo com o grau de fertilidade que os mesmos apresentam, descrevendo algumas diferenças entre garanhões férteis e subférteis dentro e fora da

estação reprodutiva (SULIMAN, 2020). Segundo esses autores, os ganhões apresentam reprodução sazonal, com a estação reprodutiva natural iniciando na primavera e se estendendo ao verão.

Neste estudo, parâmetros qualitativos e quantitativos do sêmen pós refrigeração foram comparados entre ganhões subfêrteis e férteis e entre períodos envolvendo as estações reprodutivas e fora da estação reprodutiva. Quanto à qualidade foram avaliados: volume, concentração, número total de espermatozoide, morfologia e os parâmetros do CASA, no que diz respeito às variáveis de movimento (SULIMAN, 2020).

Para tanto, 64 ejaculados foram coletados dentro e fora da estação reprodutiva, nos quais não foram encontradas diferenças nos parâmetros de qualidade do sêmen entre férteis e subfêrteis, fora da estação reprodutiva. No entanto, durante a estação reprodutiva a proporção de morfologia normal, motilidade total, progressiva, VAP (velocidade média percorrida) foram significativamente superiores no grupo de ganhões férteis (Suliman, 2020). O mesmo autor relatou diferenças entre a morfologia de ganhões férteis entre as estações reprodutivas e fora da mesma.

Na avaliação por meio do CASA, foram encontradas variações significativas quanto à sazonalidade nos parâmetros VAP, VSL, BCF (frequência de batimento ao cruzar o campo) entre os férteis e subfêrteis. O autor conclui que as diferenças entre férteis e subfêrteis foram encontradas apenas durante a estação reprodutiva, e apenas alguns parâmetros avaliados pelo CASA foram significativamente inferiores fora da estação reprodutiva em ambos (férteis e subfêrteis) (SULIMAN, 2020).

Os efeitos da sazonalidade também foram investigados na composição do plasma seminal, indicando que os mecanismos que levam às mudanças do plasma seminal em grupos de ganhões durante e fora da estação reprodutiva ainda são desconhecidos (JOHANNISSON *et al* 2020).

Tais autores investigaram as proteínas do plasma seminal como: proporção de proteínas não ligadoras de heparina, fosfatidilcolina, proteínas ligadoras de heparina. Os autores relacionaram as mensurações de testosterona e as características de bons e ruins quanto à congelabilidade com os períodos dentro e fora da estação reprodutiva, encontrando apenas pequenas variações quanto à estacionalidade; revelando de certa forma resultados controversos.

Nesse estudo foram encontradas apenas variações discretas e insignificantes quanto a cinética e quanto a morfologia espermática (JOHANNISSON *et al* 2020).

Ao analisarem os ejaculados pela citometria de fluxo e pelo potencial de membrana mitocondrial, assim como ROS (espécies reativas de oxigênio), foram determinadas diferenças dentro da estação reprodutiva.

No entanto, a integridade da membrana mitocondrial e os níveis de testosterona não apresentaram mudanças entre as estações reprodutivas e não reprodutivas (JOHANNISSON *et al* 2020).

Os autores sugerem que os ejaculados podem ser usados o ano todo para criopreservação, desde que poucas diferenças quanto a composição protéica do plasma seminal foram encontradas dentro e fora da estação, assim como entre ganhões considerados bons e ruins para os critérios de congelabilidade do sêmen. Ainda o autor afirma que a qualidade espermática não foi afetada fora da estação reprodutiva (JOHANNISSON, *et al* 2020).

## 4. Materiais e Métodos

O presente estudo foi desenvolvido com aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA), protocolo número 1900024, da Universidade Brasil (UB), Campus Descalvado, SP.

Empresas comerciais colaboraram para o desenvolvimento do presente estudo com fornecimento de: meio de criopreservação (Botupharma, Botucatu, SP), suplemento (NovEq - Saúde e Nutrição Animal Ltda, Descalvado, SP), manutenção e manejo dos animais (Centro de Reprodução Equina e Garanhões, "Gian Zanon". Araraquara, SP) e avaliações do sêmen por meio do CASA (Vet Semen, São Paulo, SP).

O presente estudo é parte integrante do projeto temático maior, intitulado: "Comportamento e performance reprodutiva de garanhões submetidos à suplementação com L-carnitina".

### 4.1 Local

O experimento foi conduzido na central de reprodução equina "Gian Zanon", Araraquara São Paulo (latitude 21°43'30.1" sul, longitude 48°13'19.0" oeste) entre os meses de abril à agosto de 2019, período que antecedeu a estação reprodutiva.

### 4.2 Animais

Durante o experimento foram utilizados quatro garanhões da raça Quarto de Milha, idade entre 6 à 24 anos, pesando média 400 kg em boas condições corporais (escore  $\geq 4$ , em escala de 1 a 5), manejados em baias individuais, os quais receberam concentrado (6 kg), volumoso (8 kg), sal mineral e água *ad libitum* e dieta com antioxidantes e compostos naturais (Supra Equi®, NovEq, Descalvado SP).

Os animais utilizados foram previamente condicionados a regimes de coletas de sêmen com vagina artificial e classificados como aptos após realização de exame andrológico.

### 4.3 Suplementação

O período de suplementação foi de 75 dias com fornecimento individual de 45 g do produto seco, em forma de pó em sachês (Supra Equi®, NovEq - Saúde e Nutrição Animal Ltda) em dose única diária, junto ao concentrado (2kg) pela manhã, diariamente.

O produto é indicado como suplemento mineral, vitamínico e aminoácido para equinos machos e fêmeas em idade reprodutiva.

Segue a composição do produto, bem como os níveis de garantia por Kg nas concentrações mínimas de consumo: Ácido fólico (1200 mg/kg), Beta caroteno (44,5 g/kg), L-carnitina com complementos fitoterápicos (334g/kg), vitamina C (22,3 g/kg) e vitamina E (27800 UI/kg).

### 4.4 Coletas de sêmen

Quatro garanhões da raça Quarto de Milha foram inicialmente submetidos ao esgotamento das reservas espermáticas do epidídimo, período denominado nivelamento biológico basal, no qual foram realizadas seis coletas com intervalo de 48 horas antes do início do experimento, denominado período E.

Após esse período, os animais foram submetidos a seis coletas consecutivas, com intervalo de 48 horas e os ejaculados destinados à congelação, denominado período C.

Os mesmos procedimentos descritos foram realizados após o período de suplementação, descrito conforme o cronograma no item a seguir (Figura 1).

As avaliações do ejaculado fresco foram realizadas *em loco* no laboratório da central de reprodução equina “Gian Zanon”.

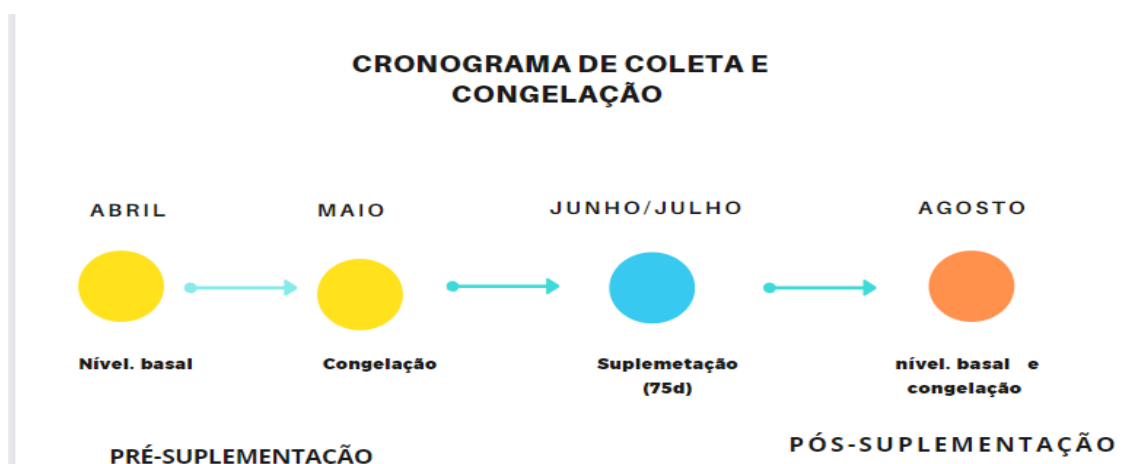
#### 4.4.1 Cronograma experimental

Período pré suplementação: nivelamento biológico basal, teve início em meados do mês de abril e a criopreservação iniciou-se no mês de maio (outono).

Suplementação: Início no final de maio, estendendo-se até junho e julho.

Período pós suplementação: nivelamento biológico basal teve início em agosto seguido pela criopreservação neste mesmo mês (inverno).

**Figura 1-** Esquema dos procedimentos envolvendo os períodos pré- suplementação, suplementação e pós- suplementação com antioxidantes e compostos naturais em garanhões da raça Quarto de Milha.



Nivelamento - basal: fase E (esgotamento), Congelação: fase C (criopreservação do semen).  
Suplementação: antioxidantes e compostos naturais adicionados ao concentrado uma vez ao dia.

#### 4.4.2 Higienização, preparação e obtenção do ejaculado

Antes da colheita dos ejaculados, foi realizada a higienização do pênis de cada garanhão, com água corrente e secagem com compressa estéril para a remoção das sujidades.

As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial (VA), Modelo Botucatu, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil. Outro modelo de vagina artificial (modificada modelo colorado / Gian Zanon), foi utilizado para a coleta de apenas um dos garanhões já condicionado à mesma, com temperatura em média de 48°C.

Este garanhão, excepcionalmente, demandava temperaturas mais altas e vagina com mucosa de látex diretamente em contato com o pênis, sendo a mesma previamente lubrificada também com KY gel não espermicida.

Utilizou-se uma égua no estro para estímulo e o manequim para a monta. A temperatura interna da vagina durante as demais coletas esteve entre +42 a +45°C, verificada por termômetro no momento prévio à coleta.

Após a coleta, a vagina foi removida do pênis do garanhão e o copo coletor levado até o laboratório para processamento da amostra.

#### **4.5 Avaliação e processamento do ejaculado no laboratório**

A fração gel foi removida com o auxílio de um filtro de nylon e o volume do ejaculado mensurado em proveta graduada. A concentração foi determinada por meio de câmara de Neubauer, após a diluição do sêmen em água na proporção 1:20. Outros parâmetros avaliados no sêmen fresco foram aspecto, cor, odor e motilidade, tanto no período de nivelamento basal, quanto durante a congelação.

##### **4.5.1 Motilidade**

Uma gota de sêmen foi colocada sob a lâmina e recoberta por lamínula, previamente aquecidas a 37 °C, e a porcentagem de espermatozoides móveis foi registrada por meio de visualização da motilidade circular aberta (característica do sêmen equino, devido a inserção abaxial da cauda do espermatozoide).

Para tanto utilizou-se o aumento de 10x e 40x na microscopia de luz. Subsequente à avaliação inicial, o sêmen foi diluído em meio de refrigeração (Botu sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP), na proporção 1 (meio): 1(sêmen) e uma gota de sêmen diluído foi submetida novamente à avaliação para motilidade como descrito acima.

##### **4.5.2 Concentração**

Após as avaliações descritas acima, o sêmen fresco foi submetido à preparação para diluição 1:20 na câmara de NeuBauer, conforme descrito por PAPA (2020). A concentração do ejaculado foi obtida em valor adquirido na câmara e multiplicado por milhões / mL.

##### **4.5.3 Volume do ejaculado e volume de gel**

O volume de gel obtido após a ejaculação foi determinado por meio de filtração do conteúdo e mensurado na proveta, logo após a coleta. Ao remover a fração gel, o volume obtido foi mensurado em bureta graduada, previamente aquecida dentro da estufa a 37° C.

#### **4.6 Criopreservação**

Foram utilizados 48 ejaculados (24 obtidos pré suplementação e 24 pós suplementação) como ilustrado na figura 1. Imediatamente após a determinação da concentração, foram separadas alíquotas em tubo de 15 mL, após a diluição do ejaculado 1:1 (v/v) com o diluente a base de leite (Botu-sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), centrifugada a 600g em centrífuga convencional (Centri bio®, modelo 80 - 2 B) por 10 min.

Posteriormente, desprezado o sobrenadante e o “pellet” ressuspendido com diluente comercial a base de gema de ovo (Botu-Crio®, Botupharma, Botucatu-SP, Brasil), previamente descongelado em banho maria a 37° C, com volume (dependendo do volume coletado e concentração, a fim de deixá-lo na concentração de 400 milhões por ml) de acordo com cada ejaculado.

As amostras foram então envasadas em palhetas previamente identificadas com dados dos garanhões e data de processamento. Utilizaram-se palhetas francesas IMV de 0,5 mL nas quais a concentração foi de 200 milhões de spz totais por palheta e lacradas com álcool polivinílico sendo a concentração de sêmen dentro das palhetas ( $400 \times 10^6$  /mL).

As amostras foram colocadas em geladeira (Frigobar Electrolux Branco 79 Litros RE-80 110 Volts a 4 °C) em bandeja horizontal, com temperatura interna controlada por termômetro e submetidas a refrigeração, representada por velocidade de -1°C/min entre 25°C e 5°C, com duração 20 min.

As palhetas foram submetidas à curva negativa pelo método tradicional, segundo Papa et al. (2008). Utilizou-se uma caixa de isopor com capacidade para 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) até a marca de 3,5cm de altura.

As palhetas foram dispostas horizontalmente, 6 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos em vapor de LN2 em curva média ~ -25°C/min até atingir uma temperatura de ~ 208 -140°C, após este período, imersas em LN2 e armazenadas em botijão criobiológico para posteriores avaliações.

Após realizado o processo de congelação, as palhetas francesas (0,5 mL) foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C, colocadas em globettes de acordo com a identificação do garanhão, com a data da coleta/ processamento e então armazenados em botijões criogênicos (- 196°C)

#### **4.6.1 Armazenamento das palhetas de sêmen criopreservadas**

Os botijões foram mantidos nas dependências da empresa Laguna Gens, Descalvado SP, abastecidos e monitorados pela mesma companhia, parceira do estudo. Após aproximadamente seis meses as amostras foram destinadas às avaliações por meio do *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) (HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12).

#### **4.7 Avaliação CASA**

Para que as avaliações fossem realizadas, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 46°C por 20 segundos (DELL' AQUA JR. et al., 2001), transferidas para um mini tubo plástico (eppendorf) de 2,0 mL e mantidas a 37°C por 10 min e avaliadas em seguida.

#### 4.7.1 Cinética espermática

As amostras foram avaliadas após a descongelação em sistema computadorizado CASA (HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12), nos seguintes parâmetros: (MT%), motilidade progressiva (MP%), espermatozoides rápidos (RAP%) velocidade média da trajetória (VAP $\mu$ m/s), espermatozoides rápidos (RAP%) velocidade média da trajetória (VAP $\mu$ m/s), velocidade linear progressiva (VSL $\mu$ m/s), velocidade curvilínea (VCL $\mu$ m/s), amplitude lateral de cabeça (ALH $\mu$ m), progressividade (STR%), linearidade (LIN%). Variável WOB Índice de Oscilação. Para cada amostra de sêmen foram observados cinco campos aleatórios em câmara de Mackler, respeitando o número mínimo de 200 células por campo.

#### 4.7.2 Integridade de membrana plasmática e morfologia espermática

As avaliações de integridade de membrana foram realizadas no mesmo laboratório privado citado anteriormente (Vet sêmen, Alphaville SP). Para tanto foram utilizadas sondas fluorescentes: Diacetato de 6- carboxifluoresceína e iodeto de propídeo (CFDA/PI), de acordo com a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990) e modificada por Arraztoa (2017).

Segue brevemente: 100  $\mu$ l de sêmen foi incubado a 37°C durante 15 minutos em 1 mL de solução salina (NaCL 140 mmol L<sup>-1</sup>; Glicose 10 mmol L<sup>-1</sup>; KCL 2,5 mmol L<sup>-1</sup>; PVP 0,5 mmol L<sup>-1</sup>; HEPES 20 mmol L<sup>-1</sup>. pH 7,55. 300 mOsm kg<sup>-1</sup>), contendo 20  $\mu$ l de solução estoque de CFDA (carboxifluoresceína: 0,5 mg ml<sup>-1</sup> em dimethylsulphoxide).

Então, 20  $\mu$ l da solução estoque de IP (Iodeto de propídeo: 0.5 mg ml<sup>-1</sup> em solução salina isotônica) foi adicionada à amostra e foi incubada por 15 minutos. A porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra, ou seja viáveis (IP, NEGATIVOS) foi determinada por meio de microscopia de fluorescência (Leica DMLS , 400x), filtros correspondentes (CFDA: BP 450–490 nm e LP 515 nm; IP: BP 515–560 nm E LP 590 nm). Total de 200 espermatozoides foram avaliados em cada amostra (ARRAZTOA et al, 2017).

As sondas fluorescentes ao penetrarem na membrana espermática rompida originam a coloração vermelha no espermatozoide e uma vez a membrana preservada, a fluorescência verde com nuances das colorações entre vermelho e verde podem estar presentes na leitura das lâminas.

#### Morfologia espermática

Além da integridade de membrana, a morfologia espermática foi avaliada após diluição de alíquota do sêmen descongelado em citrato de sódio formolizado a 4% para fixação e levado ao microscópio de contraste de fase (x1000), em preparação úmida entre lâmina e lamínula. Foram avaliadas 200 células e classificadas de acordo com a região da alteração morfológica encontrada no espermatozoide (HAFEZ & HAFEZ 2004) .

#### 4.8 Análise estatística

Dados obtidos na análise do sêmen fresco foram submetidos à Anova e aos testes de comparação não paramétricos, utilizando *software Statistics* sendo representados pelos *Box plots*. Os dados obtidos após as análises do sêmen no CASA e para as variáveis integridade de membrana e morfologia,

tiveram suas médias submetidas ao Proc MIX, SAS (Agarwal & Said, 2004) e ao teste F de comparação entre as médias.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Sêmen fresco

Os resultados das avaliações obtidas por meio da microscopia de luz foram descritos pelos gráficos Box - plots (Figura 2 à Figura 15).

#### 5.1.1 Concentração

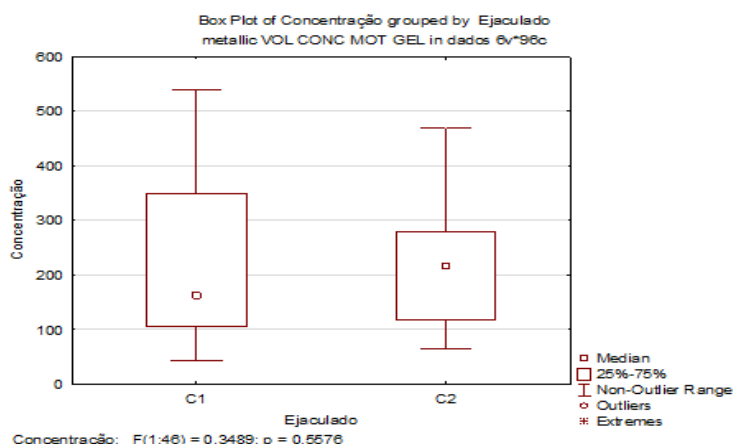
A concentração espermática média antes da suplementação esteve abaixo de 200 milhões por mL de espermatozoides, enquanto após a suplementação este valor foi representado por uma média acima de 200 milhões por ml.

Embora, as médias não foram representadas por diferenças significativas, a produção de espermatozoides por mL (concentração) foi numericamente superior no período pós suplementação, o que sugere maior produção espermática neste período, possivelmente havendo influência positiva da suplementação na espermatogênese (Figura 2).

Inúmeros fatores podem estar associados com o incremento da espermatogênese, como a evolução da idade de um dos garanhões, o qual iniciou as coletas com seis anos de idade e ao adentrar ao período pós suplementação, o qual foi mais próximo à estação reprodutiva (mês de agosto), pode ter sofrido influência positiva no aumento da produção espermática (DOWSETT & KNOTT, 1996; GREISAR ET AL 2020).

No entanto, a literatura traz informações sobre os efeitos da sazonalidade em termos de qualidade espermática e aborda de forma discreta diferenças em termos de concentração espermática (AURICH et al 2018, SULIMAN, 2020; JOHANNISSON et al 2020).

Figura 2 - **Concentração** espermática (número de espermatozoides por mL x10<sup>6</sup> no ejaculado Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação

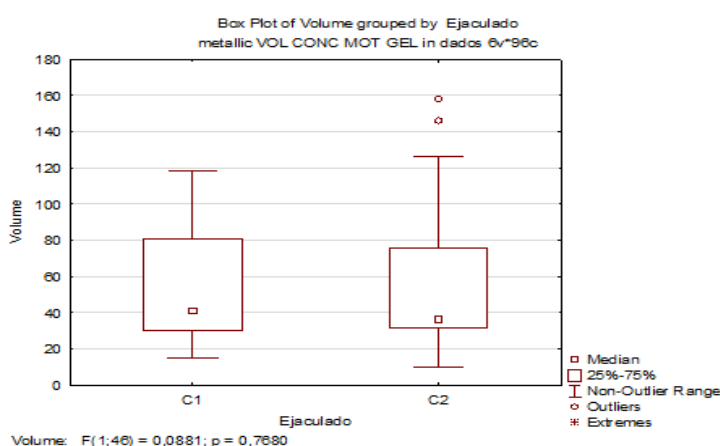


C1 e C2 : médias e desvio do período destinado às coletas para criopreservação do sêmen pré- suplementação e pós suplementação.

### 5.1.2 Volume

O volume não variou entre os momentos pré e pós suplementação, apresentando algumas coletas no momento pós, caracterizadas por volumes extremamente altos, vistos como “outliers” pela análise boxplot, abaixo descrita. (Fig 3)

Figura 3 - **Volume** do ejaculado no momento Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



C1 e C2 : médias e desvio do período destinado às coletas para criopreservação do sêmen pré- suplementação e pós suplementação.

### 5.1.3 Motilidade

A motilidade não diferiu estatisticamente, em termos de média , no entanto um valor numérico inferior, entre 50% e 60% foi observado no momento pós suplementação, comparado à 70% no momento pré suplementação. Embora os valores em ambos momentos estejam dentro dos parâmetros necessários para a utilização do sêmen na criopreservação.

O desvio padrão da média em ambos períodos encontrou-se dentro de 30 % de motilidade, o que é preconizado como aceitável para o sêmen pós descongelamento (PAPA, 2020).

Vale salientar que os garanhões permaneceram sem atividades de coleta durante os 75 dias de suplementação, o que pode ter influenciado na motilidade após este período. Mesmo tendo sido submetidos ao procedimento de nivelamento biológico basal (coletas para esgotamento das reservas espermáticas), o período pós difere do pré, quanto a sazonalidade.

Assim, ao iniciarmos as coletas, apesar dos garanhões estarem parados no mês de abril, este período vem depois da transição do verão para o outono, sendo o verão a estação reprodutiva propriamente dita (AURICH, 2016 & KUHL et al 2016 ).

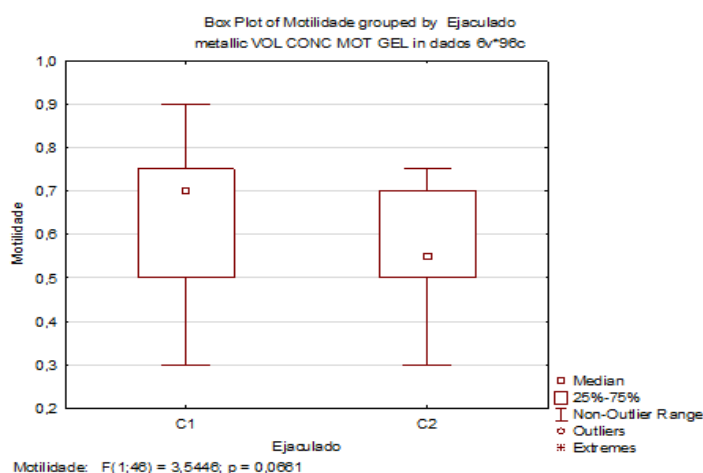
Os efeitos dos períodos transicionais em um clima tropical como na região do estudo, podem ser menos expressivos com relação ao hemisfério norte, no qual as estações são bem definidas.

Neste sentido, a maioria das informações disponíveis na literatura encontram-se baseadas nas condições do hemisfério norte e não nas condições tropicais do Brasil (AURICH et al 2018, SULIMAN, 2020; JOHANNISSON et al 2020)

Desta forma, vale comparar os dados ambientais, também presentes no projeto temático maior, intitulado: “Comportamento e performance reprodutiva de garanhões submetidos à suplementação com L-carnitina”, os quais podem revelar informações inéditas quanto aos efeitos da sazonalidade em clima tropical (região extremamente quente).

Estas observações seriam pautadas não apenas em relação às horas de luz, como revela a literatura ainda escassa, mas também quanto às variáveis ambientais (temperatura, umidade relativa do ar, velocidade do vento e pressão atmosférica) registradas nos sensores e termômetros presentes no local do estudo, durante as fases experimentais, os quais registraram os índices de ambiência.

Figura 04 - **Motilidade espermática** Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



C1 e C2 : médias e desvio do período destinado às coletas para criopreservação do sêmen pré- suplementação e pós suplementação.

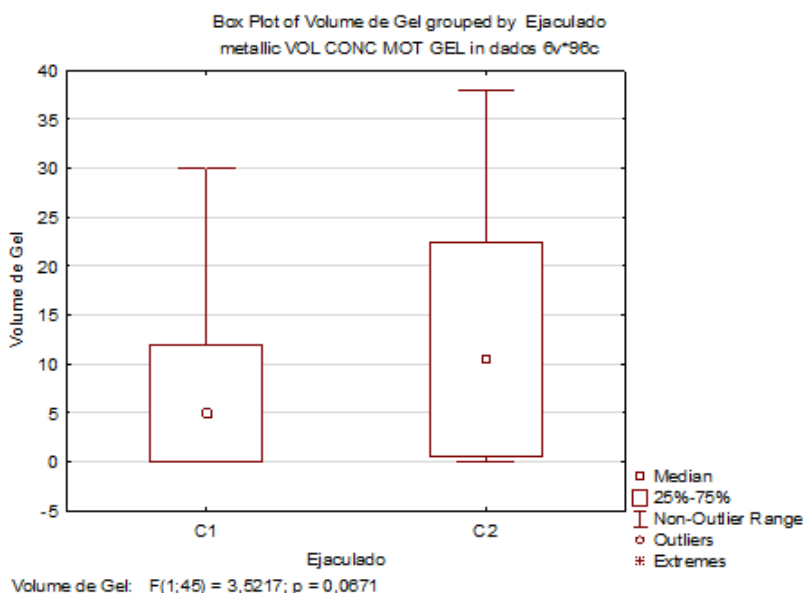
#### 5.1.4 Volume de gel

O volume de gel não apresentou diferença significativa, embora este tenha sido representado por média de 10 mL no pós suplementação em relação ao volume de 5mL, no pré suplementação. Sabe -se que o volume de gel no ejaculado está relacionado ao grau de excitabilidade do garanhão quando exposto a égua para estímulos sensoriais pré coleta.

Portanto, o aspecto comportamental, caracterizado por maior libido e excitação do garanhão no momento da coleta de sêmen no manequim com

estímulo da presença da água, pode ter afetado o volume de produção desta fração gel após o período de suplementação. Tal comportamento pode influenciar no volume total do ejaculado, consequentemente resultando em maior produção da fração gel (YOUNGQUIST AND THRELFALL, 2006).

Figura 05 - **Volume de gel do ejaculado no momento** Pré (C1) e Pós ( C2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



C1 e C2 : médias e desvio do período destinado às coletas para criopreservação do sêmen pré- suplementação e pós suplementação.

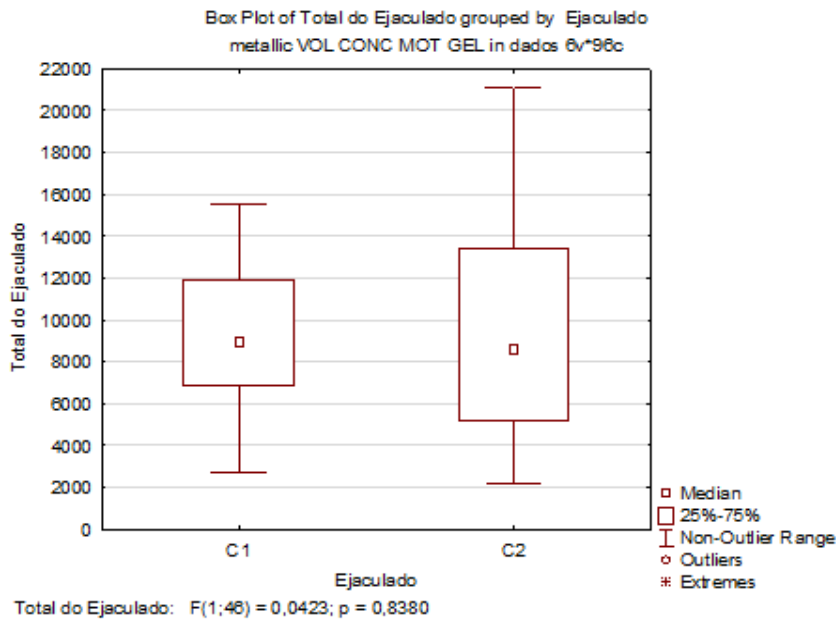
### 5.1.5 Concentração total (Total do ejaculado)

Quando a concentração de espermatozoides por mL é multiplicada pelo volume total do ejaculado (exceto o gel), tem-se a concentração total no ejaculado, a qual esteve entre 8 e 10 bilhões de espermatozoides em ambos períodos, não revelando aumento da produção espermática total no ejaculado total (Figura 6).

Vale salientar que no período pós, 75 % das coletas apresentaram ejaculados com concentração total acima de 13 bilhões e o desvio padrão foi alto, revelando possíveis exceções quanto à concentração total para valores superiores que chegam acima de 20 bilhões.

O caráter individual de cada animal (SIEME et al , 2015), pode ter mascarado a possibilidade de encontrarmos diferenças significativas quanto a este parâmetro.

Figura 06 - **Concentração total no ejaculado** (Número de espermatozoide x  $10^6$  / ML X Volume total do ejaculado)



Total do ejaculado: concentração total do ejaculado (número de espermatozoides por mL x volume do ejaculado). C1 e C2 : médias e desvio do período destinado às coletas para criopreservação do sêmen pré- suplementação e pós suplementação.

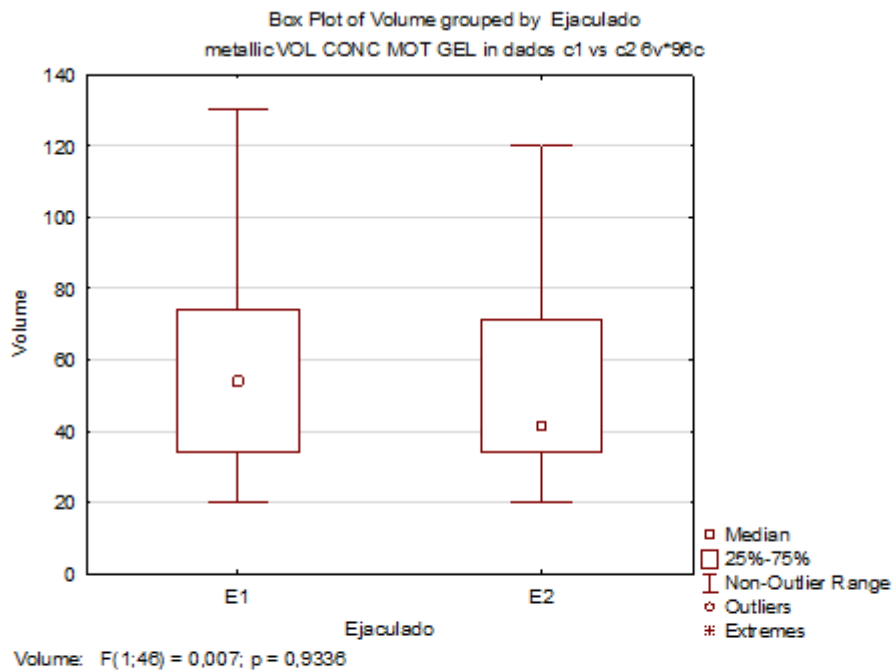
## 5.2 Sêmen fresco / Nivelamento Basal

Nos próximos gráficos (figuras 07 - 10) estão ilustradas as médias obtidas durante os períodos de nivelamento biológico basal (esgotamento): E1 e E2 (pré e pós suplementação), os quais foram realizados precedendo os períodos para criopreservação já discutidos acima.

### 5.2.1 Volume do ejaculado

O volume não diferiu estatisticamente, ao iniciarmos as coletas em ambos os períodos, embora no período pré suplementação tenha sido representado por valor numericamente superior ao pós - suplementação.

Figura 07 - **Volume do ejaculado** - Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação com compostos em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.

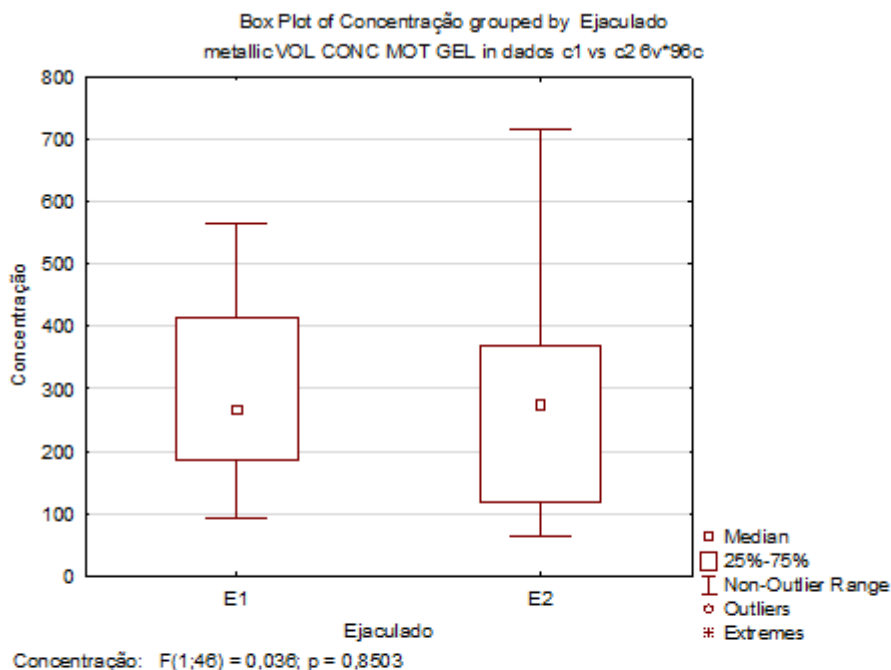


E1 e E2: média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) pré e pós suplementação.

### 5.2.2 Concentração do ejaculado

Não houve diferença entre as concentrações espermáticas por mL pré e pós suplementação.

Figura 08 - **Concentração do ejaculado** Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



E1 e E2 : média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas pré e pós suplementação).

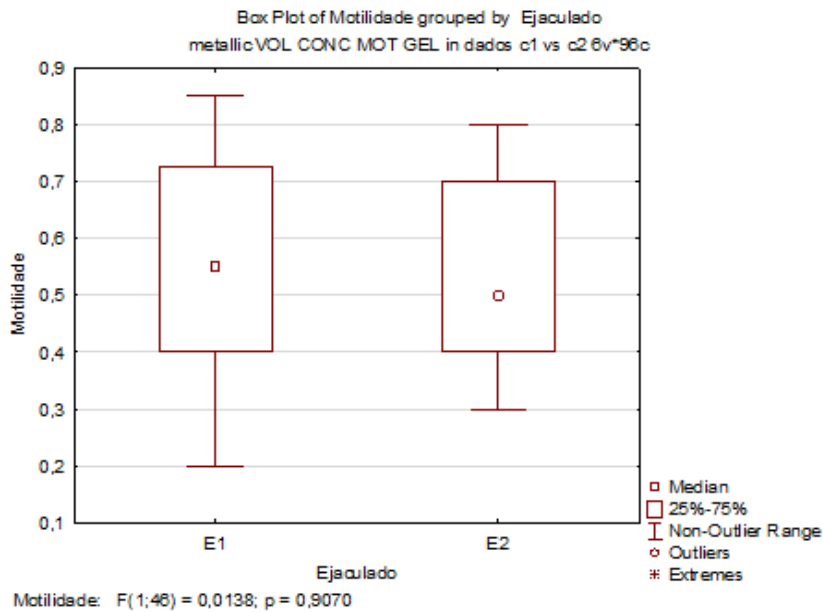
### 5.2.3 Motilidade

Não houve diferença entre a motilidade pré e pós , no entanto , em ambos períodos as médias ficaram entre 60% e 50%, o que possivelmente reflete nos resultados do sêmen após manipulação. Vale salientar que neste período, o sêmen não foi utilizado para criopreservação, tratando-se de esgotamento das reservas espermáticas do epidídimo (nivelamento basal).

Quanto a parada na rotina de coleta de sêmen durante a suplementação, o período E2 pode ter sofrido efeitos mais expressivos do que o E1, o qual vem logo após a transição de verão para o outono, o que pode ter influenciado positivamente este período.

As investigações quanto aos períodos transicionais nos ganhões são escassas nas condições tropicais quando comparadas às informações no Hemisfério Norte e Europa (AURICH, 2016 & KUHL et al 2016 ).

Figura 09 - **Motilidade espermática do ejaculado** - Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em ganhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



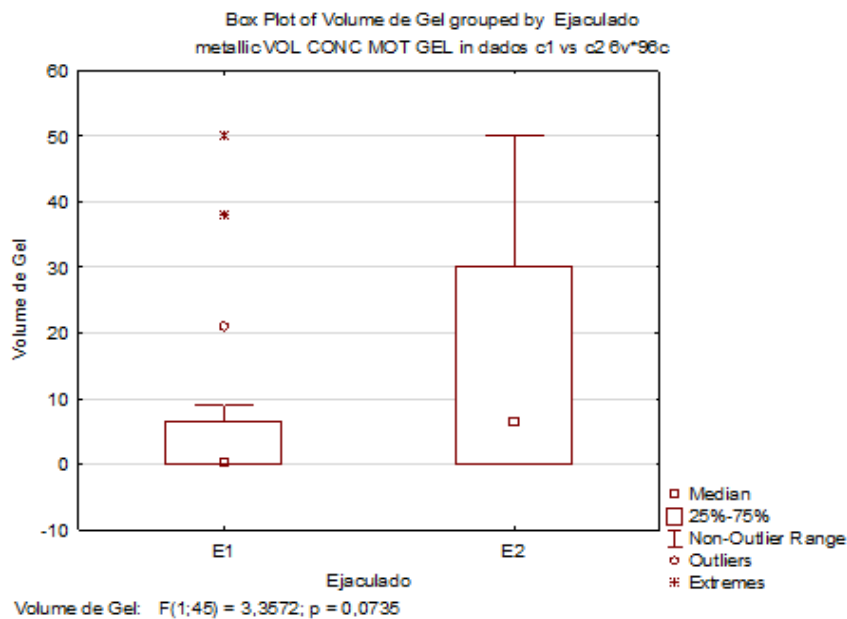
E1 e E2 : média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas pré e pós suplementação).

#### 5.2.4 Volume do gel

No início do experimento, no período E1, observou-se valores extremos e “*out liers*”, assim como média numericamente inferior, sem valores no quartil abaixo de 25%.

Esses resultados não homogêneos (presença de *out liers* extremos, ausência de valores abaixo do quartil 25%) podem ser atribuídos aos aspectos de condicionamento dos animais no ambiente de coleta, caracterizando as primeiras montas executadas, inclusive pelo garanhão mais novo, com 6 anos de idade e ao contato dos animais, especialmente do inciante, com a equipe de trabalho, podendo influenciar nas manifestações de libido, observadas com o estímulo dos mesmos à presença da égua no cio contida na sala de coleta.

Figura 10 - **Volume de gel do ejaculado no momento** Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



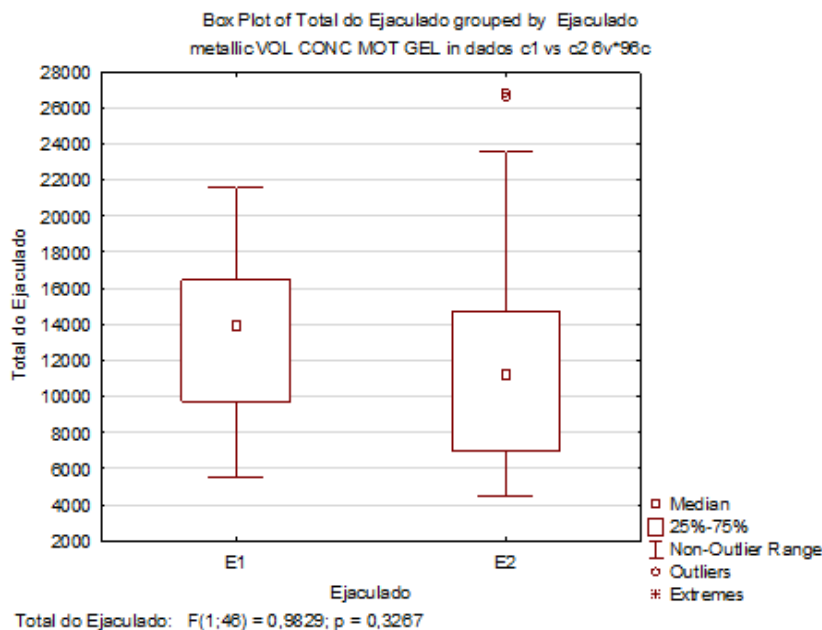
E1 e E2 : média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal ( esgotamento das reservas espermáticas pré e pós suplementação).

### 5.2.5 Concentração total (Total do ejaculado)

As médias não diferem para este parâmetro em ambos períodos, embora no pós suplementação, ocorram *outliers* e valores extremos, havendo também maior dispersão dos dados.

Esses resultados podem refletir as consequências da parada das rotinas de coleta durante a suplementação, podendo haver maior reserva espermática no epidídimo a ser eliminada durante este período.

Figura 11 - **Concentração total no ejaculado** Pré (E1) e Pós ( E2 ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



Total do ejaculado: concentração total do ejaculado (número de espermatozoides por mL x volume do ejaculado)

E1 e E2 : média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) pré e pós suplementação.

### 5. 3 Sêmen fresco / nivelamento basal / criopreservação do sêmen

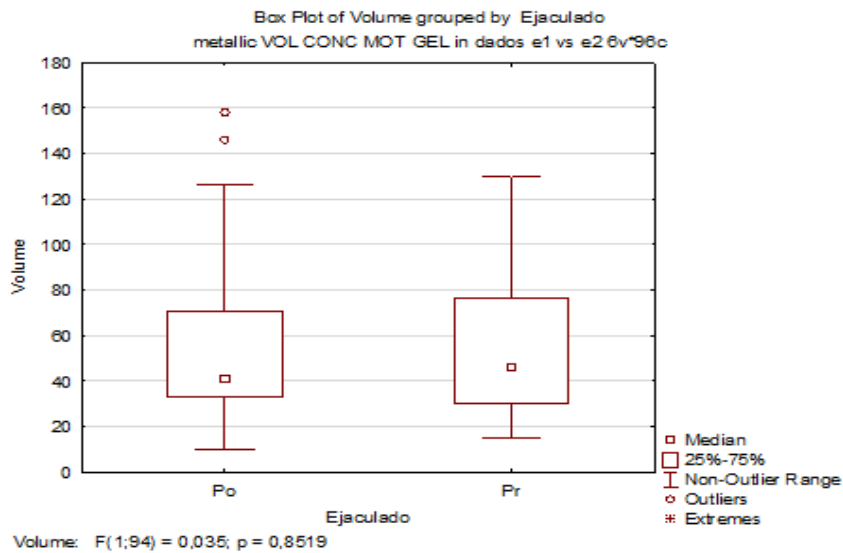
#### Resultados das coletas considerando os períodos de nivelamento basal e criopreservação do sêmen.

As coletas realizadas para nivelamento biológico basal (esgotamento) e as coletas realizadas para o uso do sêmen submetido à criopreservação foram avaliados em conjunto, resultando nos gráficos boxplot abaixo, representados por PO= E2+C2, PR= E1+ C1.

#### 5.3.1 Volume da concentração

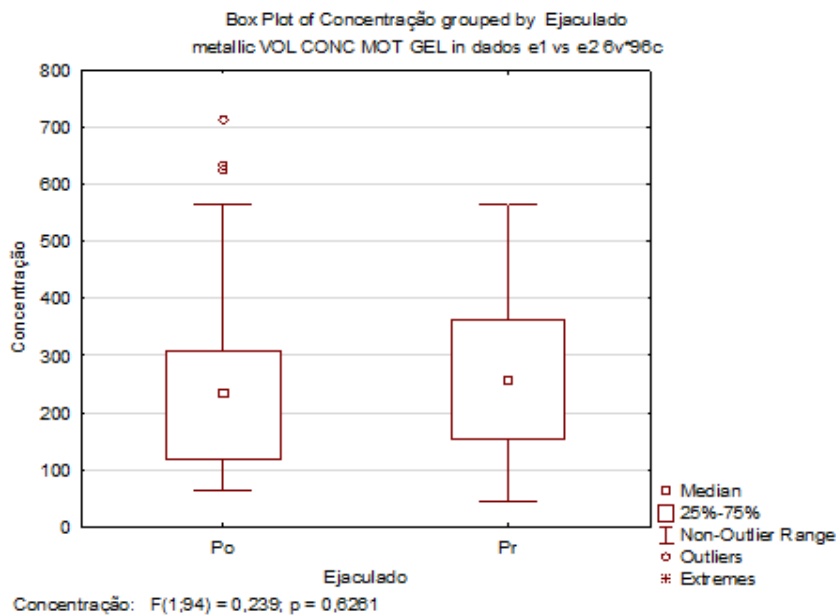
Não houve diferença significativa nas médias pré e pós quanto ao volume e concentração do ejaculado. No entanto, há *outlier* e no momento pós, ilustrado como PO, sendo o momento pré mais homogêneo quanto aos dados para ambos parâmetros (Figura 12 e Figura 13) .

Figura 12 - **Volume** Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



Po e Pr: média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) somado às médias do período para coleta e criopreservação nos momentos pós e pré suplementação. PO: E2+ C2; PR: E1+ C1.

Figura 13 - **Concentração** Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.

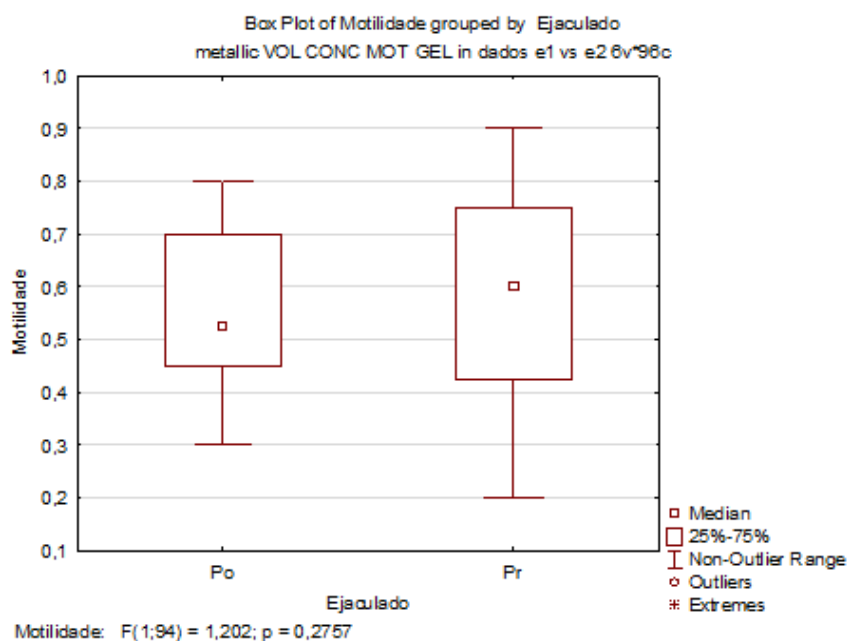


Po e Pr: média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) somado às médias do período para coleta e criopreservação nos momentos pós e pré suplementação. PO: E2+ C2; PR: E1+ C1.

### 5.3.2 Motilidade

Não houve diferença significativa neste parâmetro, estando os valores de motilidade espermática acima de 50 % e 60%, assim como descrito nos gráficos anteriores.

Figura 14 - **Volume** Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.

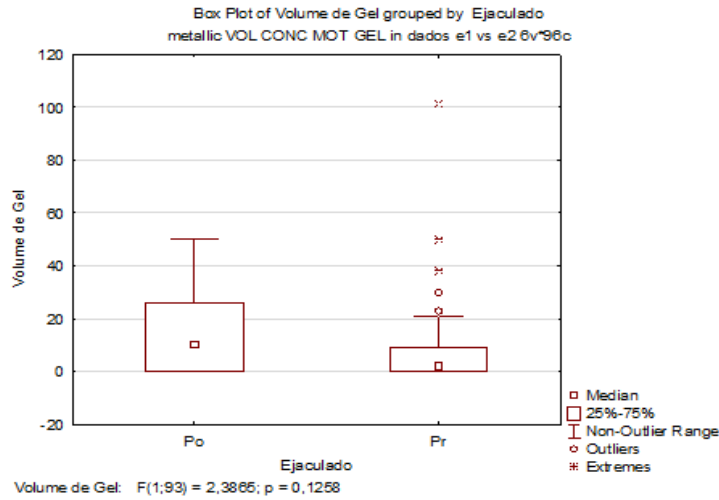


Po e Pr: média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) somado às médias do período para coleta e criopreservação nos momentos pós e pré suplementação. Po: E2+ C2; Pr: E1+ C1.

### 5.3.3 Volume de gel

No início do experimento, período PR: E1 e C1 (Figura 15), observou-se valores extremos e “outliers”, assim como média numericamente inferior, sem valores no quartil abaixo de 25 %. Assim como observado no E1, ilustrado separadamente (Figura 10). Esses resultados podem ser atribuídos aos aspectos de condicionamento dos animais no ambiente, com a equipe de trabalho e com a questão do comportamento e libido.

Figura 15 - **Volume** Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.

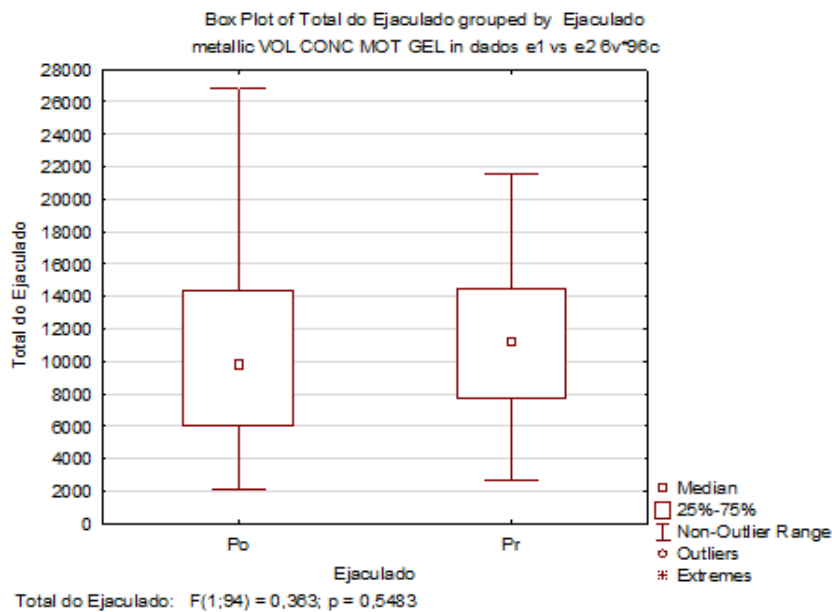


Po e Pr: média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) somado às médias do período para coleta e criopreservação nos momentos pós e pré suplementação. PO: E2+ C2; PR: E1+ C1.

### 5.3.4 Concentração total (Total do ejaculado)

As médias das concentrações totais do ejaculado no Pr e Po, não diferem significativamente, estando entre 12 e 10 bilhões de espermatozoides. No entanto, no período pós observou-se maior desvio padrão da média.

Figura 16 - Volume Pré (Pr) e Pós ( Po ) suplementação em garanhões da raça Quarto de Milha precedendo a estação reprodutiva.



Total do ejaculado: concentração total do ejaculado ( número de espermatozoides por mL x volume do ejaculado).

Po e Pr: média do período destinado à coleta para o nivelamento biológico basal (esgotamento das reservas espermáticas) somado às médias do período para coleta e criopreservação nos momentos pós e pré suplementação. PO: E2+ C2; PR: E1+ C1.

## **5.4 SÊMEN CRIOPRESERVADO**

### **5.4.1 Resultados das avaliações do sêmen pós descongelação pelo CASA**

Quanto às avaliações do sêmen criopreservado, a primeira etapa consistiu no acompanhamento dos procedimentos executados pelo médico veterinário responsável pela central de reprodução (etapa 1) e após a suplementação, os resultados de criopreservação apresentados (etapa 2) são oriundos de procedimentos realizados pela discente de pós graduação.

Apesar da busca pelo aumento da eficiência na criopreservação do sêmen equino (Morillo Rodriguez et al 2011, Šichtař et al 2019), apenas 20% ganhões são classificados como bons quanto à produção espermática, quando a mesma é submetida à criopreservação; enquanto a produção espermática de 20 à 50% dos ganhões apresentam resultados insatisfatórios, sendo os mesmos classificados como ruins quanto a criopreservação (Vidament et al 1997 & Hoffmann *et al* 2011).

Neste sentido, os ganhões da raça Quarto de Milha avaliados no presente estudo, mesmo com suas individualidades podem ser classificados como bons, no que diz respeito à criopreservação espermática e resultados da avaliação CASA. As médias dos parâmetros avaliados em ambos períodos estão dentro dos valores aceitáveis para sêmen após a criopreservação (Tabela 1).

No entanto, observam-se diferenças significativas em determinados parâmetros avaliados pelo CASA quando os períodos são comparados. Tais variáveis foram relacionadas à motilidade, velocidade, linearidade, retilinearidade e amplitude de movimento (Tabela 1).

A maioria delas apresentou valores superiores quando o sêmen foi criopreservado no período pré suplementação pelo médico veterinário da central e com exceção das variáveis: linearidade e retilinearidade dos movimentos espermáticos, as quais foram superiores no período pós suplementação, durante o qual o sêmen foi processado pela técnica em treinamento (Tabela 1).

**TABELA 1** - Cinética, morfologia e integridade de membrana no sêmen criopreservado de garanhões da raça quarto de milha pré e pós suplementação com antioxidantes e compostos naturais antecedendo a estação reprodutiva.

Variáveis	Fases						Pr > F
	1			2			
MP	33,45	±	6,46 <sup>a</sup>	25,36	±	8,61 <sup>b</sup>	0,0001
MT	50,63	±	9,75 <sup>a</sup>	42,64	±	13,21 <sup>b</sup>	0,0066
Rapid	20,68	±	8,95 <sup>a</sup>	16,67	±	10,25 <sup>a</sup>	0,0674
VCL	80,11	±	11,95 <sup>a</sup>	63,49	±	10,45 <sup>b</sup>	<,0001
VSL	33,93	±	5,57 <sup>a</sup>	31,83	±	7,12 <sup>a</sup>	0,1940
VAP	52,35	±	7,42 <sup>a</sup>	43,13	±	8,49 <sup>b</sup>	<,0001
LIN	42,61	±	5,41 <sup>a</sup>	50,20	±	8,32 <sup>b</sup>	<,0001
STR	64,76	±	4,16 <sup>a</sup>	73,58	±	5,33 <sup>b</sup>	<,0001
WOB	65,58	±	4,85 <sup>a</sup>	65,33	±	12,80 <sup>a</sup>	0,9279
ALH	3,09	±	0,40 <sup>a</sup>	2,66	±	0,38 <sup>b</sup>	<,0001
BCF	9,67	±	1,75 <sup>a</sup>	9,17	±	0,93 <sup>a</sup>	0,1287
Membrana	40,02	±	8,21 <sup>a</sup>	40,38	±	11,66 <sup>a</sup>	0,8962
DMaior	27,87	±	10,54 <sup>a</sup>	28,17	±	11,84 <sup>a</sup>	0,8344
GOTAS	7,50	±	6,65 <sup>a</sup>	7,30	±	6,79 <sup>a</sup>	0,8742
Acrossomo	1,91	±	0,70 <sup>a</sup>	1,82	±	1,17 <sup>a</sup>	0,529
MaiorCab	5,46	±	1,96 <sup>a</sup>	4,65	±	1,70 <sup>a</sup>	0,1204
MaiorFlag	17,71	±	11,22 <sup>a</sup>	20,54	±	19,19 <sup>a</sup>	0,2561
Duplas	1,25	±	0,50 <sup>a</sup>	1,00	±	0,00 <sup>a</sup>	0,1518
DMenor	5,54	±	3,72 <sup>a</sup>	6,46	±	5,23 <sup>a</sup>	0,3820
DTotais	32,75	±	10,08 <sup>a</sup>	34,21	±	11,73 <sup>a</sup>	0,3063

\*:Valores das variáveis sobrescritos por letras diferentes, na linha, diferem pela significância do teste F (p<0,05) entre as fases 01 (pré - suplementação) e fases 02 (pós-suplementação).

## MOTILIDADE ESPERMÁTICA

A motilidade progressiva e total avaliadas mostraram-se superiores na fase pré suplementação quando comparadas à fase pós suplementação. Apesar das diferenças entre as fases, os valores das médias foram apenas 10

pontos percentuais abaixo no período pós suplementação quanto a motilidade total.

No entanto, a motilidade progressiva apresentou média abaixo de 30% (33,45% vs 25,36%). Segundo as recomendações de avaliações em sêmen pós descongelação, o mesmo deve apresentar pelo menos 30 % de motilidade total (BRINSKO et al, 2011) dentro do valor médio relatado (42,64 +- 13,21).

Como descrito, o procedimento na fase 2, possivelmente foi influenciado pela técnica e treinamento da profissional condutora dos procedimentos, embora o valor obtido na motilidade total seja aceitável e condizente com os parâmetros requeridos. Quanto à motilidade progressiva, a inserção da cauda na posição abaxial na cabeça do espermatozoide origina movimentos circulares abertos (HAFEZ & HAFEZ, 2004.) e não progressivos que pode ter influenciado nos resultados obtidos.

### **RAPID - número de espermatozoides rápidos**

O parâmetro *Rapid* não apresentou diferenças entre as fases pré e pós suplementação o que representa a estabilidade do ejaculado ao longo das coletas , não havendo influência sobre o mesmo em relação à suplementação ou demais fatores que poderiam influenciar as fases distintas como o condicionamento do animal aos procedimentos e à equipe de trabalho assim como as variações de períodos , mais distantes ou mais próximos à transição quanto à sazonalidade.

### **VELOCIDADE - VCL / VAP/ VSL/**

Os parâmetros de velocidade curvilínea (VCL) e progressiva (VAP) foram superiores no período pré - suplementação comparados ao pós suplementação. As diferenças foram representadas por 20 pontos percentuais acima antes da suplementação para a velocidade curvilínea, enquanto a velocidade progressiva foi representada por uma diminuição de 10% na média.

Esses parâmetros mantiveram-se acima de 40% de maneira geral em ambas as médias dos da fase 1 e fase 2, representando boa qualidade espermática pós- descongelação, mesmo conduzida por profissional em treinamento. O parâmetro VSL , velocidade linear progressiva, não apresentou diferença quanto às fases pré e pós suplementação.

### **LINEARIDADE LIN / RETILINEARIDADE STR**

Os valores médios para Linearidade LIN (50 vs 43) e a Retilinearidade STR (73 vs 65) foram superiores no sêmen criopreservado durante o período pós suplementação em relação ao período pré- suplementação.

### **ÍNDICE DE OSCILAÇÃO WOB**

O índice de oscilação e o batimento flagelar cruzado do espermatozoide pós criopreservação, independente das fases , não mostrou diferença.

### **AMPLITUDE LATERAL DA CABEÇA ALH**

Esta variável apresentou superioridade no valor médio pré suplementação quando comparado ao pós - suplementação (3,09 vs 2,66).

#### **5.4.2 Resultados das avaliações do sêmen pós descongelação - integridade de membrana plasmática (fluorescência) e morfologia espermática (contraste de fase).**

##### **INTEGRIDADE DE MEMBRANA**

Quanto aos parâmetros relacionados à integridade de membrana e demais aspectos morfológicos do sêmen não foram apresentadas diferenças significativas nas avaliações pré e pós suplementação.

A integridade da membrana está envolvida em vários processos fisiológicos de manutenção e sobrevivência dos espermatozoides no sistema genital feminino (GWATHMEY et al., 2006).

Além disso, atua como uma barreira seletiva entre os componentes dos ambientes intracelular e extracelular, participando do processo de capacitação espermática, da reação acrossomal, da ligação com a zona pelúcida e da fusão dos gametas (MOCÉ & GRAHM, 2008).

##### **MORFOLOGIA ESPERMÁTICA**

##### **DEFEITOS MAIORES**

A dieta adotada como tratamento foi fornecida durante 75 dias entre os períodos de coleta de sêmen (pré e pós), o qual excedem o período de espermatogênese no ganhão (55 dias) (YOUNGQUIST & THRELFALL 2007). No entanto, a qualidade do sêmen dos ganhões inclusos neste experimento, não permitiu detectar diferenças significativas por serem classificados como bons quanto à criopreservação.

Quanto à morfologia espermática, os resultados não revelaram diferenças significativas (Tabela 1) . Defeitos maiores de cabeça são diretamente relacionados à espermatogênese e não apresentaram diferenças, sendo a porcentagem relativamente baixa (5 a 10%), aceitáveis quanto aos critérios da avaliação andrológica de ganhões considerados aptos à criopreservação quanto à produção espermática (PAPA 2020; CAMILA, 2011).

A porcentagem de defeitos maiores esteve dentro do valor aceitável, ficando ao redor de 20 % em ambos os períodos. Todos os parâmetros relacionados à morfologia (Tabela 1) mantiveram estabilidade em ambos os períodos e apresentaram valores aceitáveis para o sêmen pós descongelação.

Defeitos maiores de cauda – FLAG maior (Tabela 1) não diferiram e foram representados por valores ao redor de 20% o que encontra-se dentro do esperado para as avaliações pós descongelação e refletem a adequada espermatogênese e trânsito espermático.

Estes defeitos podem ocorrer devido a manipulação incorreta do sêmen, com possíveis causas iatrogênicas, no entanto , no presente estudo, observou-se estabilidade desses parâmetros em todos os procedimentos (pré e pós suplementação), o que sugere controle de qualidade quanto à metodologia de criopreservação e avaliação da central e do laboratório (avaliação - CASA),

mesmo na fase 2, pós suplementação com a condução dos procedimentos por profissional em treinamento.

## **DEFEITOS DE CABEÇA**

Demais parâmetros como cabeça dupla, não apresentaram diferenças e mantiveram-se abaixo de 2%, o que refletiu em adequada espermatogênese e consequente boa qualidade espermática.

## **DEFEITOS TOTAIS**

A porcentagem de defeitos totais revelaram a adequada qualidade do sêmen e processo de espermatogênese favorável para os ganhões inclusos no estudo, o que confirma o potencial dos mesmos com a classificação de bons ganhões para processos de criopreservação (VIDAMENT ET AL 1997 & . HOFFMANN ET AL 2011)

### **5.5 Sazonalidade e profissionais condutores dos procedimentos de criopreservação so sêmen na fase 1 (pré- suplementação) e na fase 2 (pós suplementação).**

A influência da sazonalidade na manipulação do sêmen de ganhões vem sendo investigada pela literatura, a qual muitas vezes ainda parece controversa. Aurich 2016 e Kuhl et al 2016 relataram que a produção espermática no ganhão pode ser mais eficiente no verão.

Ainda neste sentido, a composição do plasma seminal pode sofrer alterações quanto a sazonalidade e mudanças quanto a membrana plasmática do espermatozoide (AURICH et al 2018).

No entanto, a literatura também traz informações de que não há efeitos significativos na qualidade espermática quanto à sazonalidade (JOHANNISSON et al 2020). Estes estudos mostram que não há influência na qualidade espermática que possa comprometer os processos de criopreservação do sêmen de ganhões quanto à sazonalidade, considerando os bons ganhões quanto a criopreservação (JOHANNISSON et al 2020).

O mesmo autor ainda ressalta variações não significativas quanto a cinética e morfologia espermática fora da estação reprodutiva, não encontrando também diferenças em relação à membrana mitocondrial e níveis de testosterona. Tais achados levaram às conclusões de que a qualidade espermática não foi influenciada pelas variações sazonais (JOHANNISSON et al., 2020).

Segundo Essraa M. AL-Essawe et al. (2020) o ejaculado de ganhões pode ser utilizado o ano todo, desde que pequenas diferenças em termos de composição proteica do plasma seminal existem dentro e fora da estação reprodutiva, assim como entre bons e ruins ganhões em termos de congelabilidade do sêmen.

Tais achados permitem concluir que o presente estudo realizado antes da estação reprodutiva, não sofreu influências sazonais quanto aos resultados pré e pós suplementação, e sim efeitos inerentes aos condutores dos procedimentos.

No entanto, se considerarmos a fase 1 pré suplementação , realizada no mês de abril e as condições ambientais em tal período no clima tropical em

região quente do estado de São Paulo no hemisfério Sul, podemos inferir possível influência ainda positiva neste momento, o qual foi mais próximo do verão, do que o momento pós suplementação, o qual foi conduzido em agosto, mês de inverno.

Portanto, as informações do presente estudo tornam-se inéditas quanto a real influência do período sazonal na qualidade espermática e nos efeitos desta na criopreservação, sem logicamente não considerar também a alteração de condutores nos procedimentos.

Inicialmente a criopreservação pré suplementação foi realizada por técnico experiente e após a suplementação a mesma foi conduzida por técnica treinada, o que pode ter resultado nas diferenças significativas encontradas (Tabela 1).

Vale ressaltar que mesmo com valores inferiores, as variáveis pós suplementação, as quais foram geradas pelo processamento realizado pela técnica profissional em treinamento, estiveram dentro dos valores aceitáveis pós -criopreservação, por exemplo motilidade do sêmen pós descongelação acima de 30% (Tabela 1). (ASBIA 2013, PAPA, 2020).

## **5.6 Garanhões “bons e ruins” quanto a congelabilidade**

A abordagem e análise individual de garanhões com boa ou ruim performance quanto a congelabilidade tem sido relatada (AL-ESSAWE et al, 2016; EL-BADRY, et al 2016); assim como as variações das respostas aos protocolos convencionais de criopreservação (LOOMIS & GRAHAM, 2008) (KATILA, 2001); as quais são atribuídas às diferenças na composição do plasma seminal (KARESKOKI & KATILA, 2008).

Estratégias quanto a adição de plasma seminal de bons garanhões quanto a produção espermática ao sêmen descongelado de pobre qualidade mostrou resultados promissores e trouxe evidências de que alguns componentes do plasma seminal podem ter um papel positivo e outros, papel negativo no processo de criopreservação espermática (SICHTA ET AL, 2019)

Embora não tenha sido o objetivo do presente estudo, sugere-se futuramente a verificação dos componentes do plasma seminal em garanhões submetidos à dieta com suplementação. Tais avaliações poderão revelar possível influência positiva na qualidade do ejaculado de garanhões considerados ruins para congelação.

Neste sentido, a influência da suplementação no plasma seminal, e conseqüentemente, na qualidade espermática de garanhões considerados ruins, poderia favorecer os procedimentos de criopreservação.

As diferenças na composição do plasma seminal de garanhões considerados bons ou ruins quanto à capacidade de criopreservação, permitiu a identificação de uma aminopeptidase N, com função no estímulo da motilidade espermática (AL-ESSAWE et al 2018).

No presente estudo, as médias das variáveis obtidas na fase 1 (pré - suplementação) revelaram que a população estudada pode ser considerada como “bons garanhões” quanto à congelabilidade do sêmen, o que pode ter mascarado efeitos promissores da suplementação.

## **CONCLUSÃO**

O sêmen obtido de garanhões submetidos à suplementação com antioxidantes e compostos naturais apresentou diferenças significativas nas avaliações da cinética espermática CASA apenas após a descongelação; não diferindo quanto às variáveis avaliadas na microscopia de luz, com o semensêmen fresco logo após a coleta.

Tal achado possivelmente foi resultado da diferença entre a experiência dos manipuladores do sêmen no momento pré e pós suplementação, ainda considerando fatores inerentes às condições ambientais (a serem abordados no estudo temático maior) os quais poderiam afetar fisiologicamente a produção e qualidade espermática.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Após a suplementação dos garanhões da raça Quarto de Milha com antioxidantes e compostos naturais na dieta não houve diferenças significativas nas variáveis referentes às avaliações do sêmen fresco, imediatamente pós coleta.

O sêmen obtido após o nivelamento basal, o qual foi utilizado para criopreservação apresentou numericamente valores médios superiores quanto à concentração por mL após a suplementação, o que poderia favorecer o número de palhetas a serem produzidas.

No entanto, quando avaliamos a produção média total do ejaculado, também não houve diferenças significativas e a produção ficou acima de 10 bilhões por mL em média no período pós suplementação, sendo numericamente inferior à 12 bilhões por mL, média obtida antes da suplementação.

A motilidade espermática média do sêmen fresco ficou entre 50 e 60%, no pós suplementação, demonstrando qualidade adequada para o processamento do sêmen e esta variável não apresentou diferenças significativas entre médias nos períodos pré e pós suplementação.

As variáveis espermáticas pós descongelação obtidas pela cinética no CASA, revelaram diferenças significativas para determinadas variáveis como: motilidade, velocidade, e amplitude de movimento (superiores para o momento pré versus pós suplementação) e linrealidade, retilinearidade (superiores para o momento pós versus pré suplementação).

As demais variáveis do sêmen pós descongelação, quanto à cinética (RAP, VSL, WOB e BCF), integridade de membrana e morfologia espermática não apresentaram diferenças significativas entre os momentos avaliados (pré e pós suplementação) e mesmo quando conduzidos por profissionais diferenciados quanto à experiência.

Quanto aos períodos experimentais, pré e pós suplementação, vale salientar que a fase 1, inicial, vem logo após o verão (pré suplementação) e depois a fase 2, (pós suplementação), esteve dentro do período de inverno.

Apesar de ambos os períodos estarem dentro da classificação sazonal considerada “fora e antecedendo a estação reprodutiva” de acordo com os meses, os quais as compõem, esses períodos, principalmente o pré suplementação, o qual é mais próximo do final do verão; poderia ser na verdade ainda transicional aqui nas condições do Hemisfério Sul, necessitando de maiores investigações.

Dados registrados por meio das avaliações de ambiência (sensores, equipamentos analógicos e digitais) os quais foram armazenados junto ao

“projeto temático maior” , podem revelar informações inéditas e contribuir para o entendimento dos efeitos das condições ambientais e não apenas sazonais na qualidade do sêmen de garanhões suplementados fora da estação no Hemisfério Sul.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. **Carnitines and male infertility.** *Reprod. Biomed.* 2004, 8, 376–384.

AL-ESSAWE, E.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; DRUART, X.; WULF, M.; AURICH, C.; MORRELL, J.M. **Seminal plasma components differ between “good freezer” and “poor freezer” stallions.** *Anim. Reprod. Sci.* 2016, 169, 113.

AL-ESSAWE, E.M.; JOHANNISSON, A.; WULF, M.; AURICH, C.; MORRELL, J.M. **Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma.** *Cryobiology* 2018, 81, 145–152.

ARRAZTOA CC, MIRAGAYA MH, CHAVES MG, TRASORRAS VL, GAMBAROTTA MC, PÉNDOLA CH, NEILD DM. **Porcine sperm vitrification I: cryoloops method.** *Andrologia*, 1-8; DOI: 10.1111/and.12706. 2016

ARRUDA *ET AL.* **Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions.** *R. Bras. Zootec.*, v.39, p.393-400, 2010.

AURICH, C. **Seasonal influences on cooled-shipped and frozen-thawed stallion semen.** *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 43, 1–5.

AURICH, C.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; PEÑA VEGA, F.J.; SCHRAMMEL, N.; MORCUENDE, D.; AURICH, J. **Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony stallions.** *Theriogenology* 2018, 107, 149–153.

AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. **Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation.** *Theriogenology* 1996, 46, 791–797.

BEREKET MOLLA TANGA, A, AHMAD YAR QAMAR, A, SANAN RAZA, SEONGGYU BANG, XUN FANG, KIYOUNG YOON, AND JONGKI CHO. **Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment** — A review. *Anim Biosci* Vol. 34, No. 8:1253-1270 August 2021 <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072> pISSN 2765-0189 e ISSN 2765-0235

BEREKET MOLLA TANGA, A, AHMAD YAR QAMAR, A, SANAN RAZA, SEONGGYU BANG, XUN FANG, KIYOUNG YOON, AND JONGKI CHO. **Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment** — A review. *Anim Biosci* Vol. 34, No. 8:1253-1270 August 2021 <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072> pISSN 2765-0189 e ISSN 2765-0235

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos.** Lavras: Ed FAEPE/UFLA, 1997, p. GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M. **Problemas e soluções com o uso**

**de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, Revista Brasileira de Reprodução Animal, n.6, p.210-215, 2009.**

BLOTTNER, S., WARNKE, C., TUCHSCHERER, A., HEINEN, V., AND TORNER H. **Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season, Anim Reprod Sci., 65, 75–88, [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00214-1), 2001.**

BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo.** Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo, Comissão Técnica Permanente de Bem-estar Animal e Câmara Setorial de Equideocultura, Brasília, 2016. Editoração: Assessoria de Comunicação e Eventos Elaboração: Roberto Arruda de Souza Lima – ESALQ/USP e André Galvão Cintra – FAJ

BRINSKO SP, BLANCHARD TL, HARTIMAN DL. **Manual of equine reproduction** / 2011; 3rd ed. ISBN: 978-0-323-06482-8, Copyright © 2011, 2003, 1998 by Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.

BROEKHUIJSE MLWJ, ŠOŠTARIĆ E, FEITSMA H, GADELLA BM. **Application of computer-assisted sêmen analysis to explain variations in pig fertility. J Anim Sci. 2012;90:779–89. doi: 10.2527/jas.2011-4311.**

BUDWORTH PR, AMANN RP, CHAPMAN PL. **Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. J Androl. 1988;9:41–54. doi: 10.1002/j.1939-4640.1988.tb01007.**

CHRISTA R. MORAES , ERIN E. RUNCAN, BRYAN BLAWUT, AND MARCO A. **Coutinho da Silva. Technical Note: The use of iSperm technology for on-farm measurement of equine sperm motility and concentration** Department of Veterinary Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, The Ohio State University, Columbus, OH 43210

ASBIA.COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** O Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (3.ed. - 2013)

DAVIS, R. O. AND KATZ, D. F. **Standardization and comparability of CASA instruments, J. Androl., 13, 81–86, 1992.**

DOWSETT, K.F.; KNOTT, L.M. **The influence of age and breed on stallion sêmen.** Theriogenology 1996, 46, 379–412.

E. S. E. HAFEZ, B. HAFEZ. **Reprodução animal.** Editora Manole; 7ª edição (1 janeiro 2004). 513 p.

EL-BADRY, D.A.; GAMAL, A.E.S.; EL-MAATY, A.M.A. **Seminal plasma hormonal profile of Arabian stallions that are classified ‘good’ or ‘poor’ for sêmen freezing.** Asian Pac. J. Reprod. 2016, 5, 453–458.

FREDERICO OZANAM, PAPA. **Reprodução de Garanhões** - Papa. Editora: Medvet. Ano: 2020. Páginas: 336. ISBN: 9786587442068

FREITAS-DELL'AQUA, CAMILA DE PAULA. **Técnicas avançadas na análise de alterações morfofuncionais de sêmen equino** / Camila de Paula Freitas Dell'Aqua. – Botucatu : [s.n.], 2011 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

GHADEER SABAH BUSTANI, AND FALAH HASAN BAIEE. **sêmen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of sêmen and sêmen extenders.** Veterinary World, EISSN: 2231-0916 Available at [www.veterinaryworld.org/Vol.14/May-2021/21.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.14/May-2021/21.pdf) REVIEW ARTICLE Open Access

GREISER, T.; SIEME, H.; MARTINSSON, G.; DISTL, O. **Breed and stallion effects on frozen-thawed sêmen in warmblood, light and quarter horses.** Theriogenology 2020, 142, 8–14.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L. ET AL. **Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct.** Biol. Reprod., v.75, p.501-507, 2006.e Graham, 2008).

HARRISON, R. A., & VICKERS, S. E. **Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa.** Journal of Reproduction and Fertility, 88, 343–352. (1990).

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. **Optimal concentrations of cryoprotective agents for sêmen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing.** Anim. Reprod. Sci. 2011, 125, 112–118.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. **Produção da pecuária municipal.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br> . Acesso em: 03 março de 2023.

JANETT, F., THUN, R., NIEDERER, K., BURGER, D., AND HÄSSIG, M.: **Seasonal changes in sêmen quality and freezability in the warmblood stallion,** Theriogenology, 60, 453–461, [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00046-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00046-3), 2003.

JASKO, D. J., LEIN, D. H., AND FOOTE, R. H.: **The repeatability and effect of season on seminal characteristics and Computer Aided Sperm Analysis in the stallion,** Theriogenoly, 35, 317–327, [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90282-i](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90282-i), 1991.

JIŘÍ ŠICHTAŘ , FILIPA BUBENÍČKOVÁ , JITKA SIROHI AND ONDŘEJ ŠIMONÍK . **How to Increase Post-Thaw sêmen Quality in Poor Freezing Stallions: Preliminary Results of the Promising Role of Seminal Plasma Added after Thawing.** Animals 2019, 9, 414; doi:10.3390/ani9070414.

JOHANNISSON, A.; AL-ESSAWE, E. M.; AL-SAFFAR, A. K.; KARKEHABADI, S.; LIMA-VERDE, I.; WULF, M.; AURICH, C.; MORRELL, J. M. **Season does not have a deleterious effect on proportions of stallion seminal plasma proteins.** *The Journal of Reproduction and Development*, v.66, n.3, p. 215-221, 2020.

JÖRG AURICH , JULIANE KUHL , ALEXANDER TICHY AND CHRISTINE AURICH. **Efficiency of sêmen Cryopreservation in Stallions.** *Animals* 2020, 10, 1033.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. **Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity.** *Anim. Reprod. Sci.* 2008, 107, 249–256.

KATILA T. **In vitro evaluation of frozen-thawed stallion sêmen: a review.** *Acta Vet Scand*, v.42, p.201-217, 2001.

KEFER, J. C.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. **Role of antioxidants in the treatment of male infertility.** *International Journal of Urology*, v.16, p.449-457, 2009.

KUHL, J.; SCHOTT, F.; DEICHSEL, K.; AURICH, C. **Effects of breed, age and season on quality of frozen- thawed sêmen in stallions.** *J. Equine Vet. Sci.* 2016, 43, 57–58.

L.A. YONEZAWA , T.S. BARBOSA , M.J. WATANABE , C.L. MARINHO , J.L. KNAUT , A. KOHAYAGAWA. **Efeito da suplementação com vitamina E sobre os metabolismos oxidativo e cardíaco em equinos submetidos a exercício de alta intensidade.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.1, p.71-79, 2015

LIU, D. Y., CLARKE, C. N., AND GORDON BAKER, H. W.: **Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro.** *J. Androl.*, 12, 231–239, <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1991.tb00258.x>, 1991.

LOOMIS P.R.; GRAHAM J.K. **Commercial sêmen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols.** *Anim Reprod Sci*, v.105, p.119-128, 2008.

LOPES, BETHANIA VIEIRA. **Efeito da adição e /ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis.** Bethania Vieira Lopes. - Botucatu, 2010

LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. **Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões.** *Acta Scientiae Veterinariae*, v.39, n.2, p.956-969, 2011.

MAGISTRINI, M., CHANTELOUBE, P. H., AND PALMER, E. **Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion sêmen for freezing.** J. Reprod. Fertil., 35, 127–133, 1987.

MATHEUS R. FELIX, REGINA M. TURNER, TAMARA DOBBIE AND KATRIN HINRICHS. **Successful in vitro fertilization in the horse: production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation.** †Biology of Reproduction. 2022, 107(6), 1551–1564 <https://doi.org/10.1093/biolre/ioac172>.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. **In vitro evaluation of sperm quality.** Anim. Reprod. Sci., v.105, p.104-118. 2008.

MOHAAMMED SAAD ALAMAARY, ABD WAHID HARON, MOHAMED ALI, MARK WEN HAN HIEW, LAWAN ADAMU AND INNOCENT DAMUDU PETER. **Open Access Effects of four extenders on the quality of frozen sêmen in Arabian stallions** Veterinary World. EISSN: 2231-0916 Available at [www.veterinaryworld.org/Vol.12/January-2019/4.pdf](http://www.veterinaryworld.org/Vol.12/January-2019/4.pdf)

MORILLO RODRIGUEZ, A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MACIAS GARCIA, B.; MORRELL, J.M.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PENA, F.J. **Freezing stallion sêmen with the new Caceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability.** Anim. Reprod. Sci. 2011, 127, 78–83.

NEILD, D. M., CHAVES, M. G., FLORES, M., MIRAGAYA, M. H., GONZALEZ, E., AND AGÜERO, A. **The hos test and its relationship to fertility in the stallion,** Andrologia, 32, 351–355, <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2000.00357.x>, 2000.

PAPA FO. **Reprodução de Garanhões.** ISBN: 9786587442068; Edição: 1 Ano: 2020. 336p. editora MedVet; São Paulo, SP.

PESCH, S., BOSTEDT, H., FAILING, K., AND BERGMANN, M. **Ad-vanced fertility diagnosis in stallion sêmen using transmission electron microscopy.** Anim. Reprod. Sci., 91, 285–298, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.04.004>, 2006.

PICKETT, B. W., SULLIVAN, J. J., AND SEIDEL, G. E. **Reproductive physiology of the stallion, V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoa.** output, J. Anim. Sci., 40, 917–923, <https://doi.org/10.2527/jas1975.405917x>, 1975.

ROBERT S. YOUNGQUIST; WALTER R. THRELFALL: **Current therapy in Large Animal Theriogenology,** Ed 2, Elseviere, 2007. p 1061 .

ROSIARA ROSÁRIA DIAS MAZIERO, ANDRÉ MACIEL CRESPILO, CAMILA DE PAULA FREITAS-DELL'AQUA, JOSÉ ANTÔNIO DELL'AQUA JUNIOR, FREDERICO OZANAN PAPA. **Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade.** Rev Bras Reprod Anim Supl, Belo Horizonte, n.6, p.5-10, dez. 2009

SAMPER J, HELLANDER J, CRABO B. **Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion sêmen and sêmen quality.** *J Reprod Fertil Supplement.* 1991;44:107.

SANTOLARIA P, VICENTE-FIEL S, PALACÍN I, ET AL. **Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep.** *Anim Reprod Sci.* 2015;163:82–8. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.10.001.

SCHÄFER-SOMI S, AURICH C. **Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different sêmen extenders for predilution.** *Anim Reprod Sci.* 2007;102:1–13. doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.03.019.

SENGER, P.L. **Pathways to pregnancy and parturition.** 2o Ed. STOUT, T.A.,. **Modulating reproductive activity in stallions: a review.** *Anim. Reprod. Sci.* 89, 93–103. 2003.

ŠICHTAŘ, J.; ŠIMONÍK, O.; BUBENÍČKOVÁ, F.; SVOBODOVÁ, J.; NEHASILOVÁ, A. **Improvement in sêmen Conservation of the Indigenous Czech Endangered Old Kladruber Horse: Special Focus on the Type of Extender and Packaging System.** *J. Equine Vet. Sci.* 2019, 72, 101–107.

Sieme H, Harriette O, Gunilla M, BURGER D , Wolkers WF. **Equine sêmen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocol.** *Revista. Brasileira de Reprodução Animal.* Belo Horizonte, v.39, n.1, p.11-14, jan./mar. 2015. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br). 2015.

Sieme, H., Katila, T., And Klug, E. **Effect of sêmen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions, Theriogenology,** 61, 769–784, [ttps://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00251-6), 2004.

SULIMAN YARA , FRANK BECKER , ARMIN TUCHSCHERER , AND KLAUS WIMMERS,. **Seasonal variations in quantitative and qualitative sperm characteristics in fertile and subfertile stallions.** Received: 19 October 2019 – Revised: 24 March 2020 – Accepted: 15 April 2020 – Published: 14 May 2020.

SULIMAN YARA , FRANK BECKER, ARMIN TUCHSCHERER , AND KLAUS WIMMERS. **Seasonal variations in quantitative and qualitative sperm characteristics in fertile and subfertile stallions.** *Arch. Anim. Breed.*, 63, 145–154, 2020 <https://doi.org/10.5194/aab-63-145-2020>

THRELFALL WR, **Reproductive anatomy and Physiology of breeding Stallion** p.1-12. IN: *Current therapy in Large Animal Theriogenology.* YOUNGQUIST RS, THRELFALL WR. 2007. October 10, 2006 ISBN: 9780721693231 EDITION SECOND Saunders USA. 1088p.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAÏN, A.; NOUE, P.; **Palmer, E. Equine frozen sêmen: Freezability and fertility field results.** *Theriogenology* 1997, 48, 907–917.

VIEIRA, RICARDO. **Fundamentos da Bioquímica**. Universidade Federal do Pará, Belém – Pará 2003.

VIUDES-DE-CASTRO MP, MOCÉ E, VICENTE J, MARCO-JIMÉNEZ F, LAVARA R. **In vitro evaluation of in vivo fertilizing ability of frozen rabbit sêmen**. *Reprod Domest Anim*. 2005;40:136–40. doi: 10.1111/j.1439-0531.2005.00568.x.

WACH-GYGAX, L., BURGER, D., MALAMA, E., BOLLWEIN, H., FLEISCH, A., JEANNERAT, E., THOMAS, S., SCHULER, G., AND JANETT, F.: **Sea-sonal changes of DNA fragmentation and quality of raw and cold-stored stallion spermatozoa**, *Theriogenology*, 99, 98–104, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.025>, 2017.

WARNKE, C., BLOTTNER, S., KANITZ, W., TUCHSCHERER, A., AND TORNER,H.: **Changes of movement and morphology in stallion spermatozoa between breeding and non-breeding season**, *Arch.Tierz. Dummerstorf*, 44, 184 pp., [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00214-1), 2001.

WHITESELL, K., STEFANOVSKI, D., MCDONNELL, S., AND TURNER, R.: **Evaluation of the effect of laboratory methods on sêmen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions**, *Theriogenology*, 142, 67–76, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.035>, 2019.