

Inclusão de ergotioneína e cisteamina em diluidor de criopreservação de sêmen equino resulta em redução expressiva de parâmetros de movimento espermático

Larissa Rodrigues Santana¹, William Morais Machado¹, Bianca da Silva Abreu², Késsia Sheille Santos Mendes¹, Ivan Bezerra Allaman³, Paola Pereira das Neves Snoeck^{*1}

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

² Faculdade de Irecê, Irecê, Bahia, Brasil

³ Departamento de Ciências Exatas da UESC

*E-mail: paolasnoeck@uesc.br

A criopreservação de sêmen é um processo necessário para garantir sobrevivência celular por um tempo prolongado, mas bastante desafiador para os espermatozoides, já que a redução de temperatura até -196°C acarreta em alterações na membrana plasmática, desidratação celular, estresse osmótico e oxidativo, lesões no DNA, além de lesões causadas pela toxicidade dos crioprotetores intracelulares. Na tentativa de minimizar o estresse que os espermatozoides sofrem durante a congelação e descongelação são adicionadas aos meios diluidores diferentes substâncias crioprotetoras intra e extracelulares. Os antioxidantes são utilizados para proteger os espermatozoides de possíveis lesões provocadas pelo estresse oxidativo que podem resultar em peroxidação lipídica. A ergotioneína é um aminoácido hidrofílico natural, um nutriente e antioxidante que demonstrou eliminar espécies reativas de oxigênio. Além de proteger o espermatozoide de produtos químicos derivados da frutólise, resultando em melhoria na motilidade e integridade do DNA depois da congelação e descongelação. A cisteamina (2-aminoetanol), um antioxidante aminaol conhecido por ser um eliminador eficiente do radical hidroxila, aumenta a síntese de glutatona e pode contribuir para a manutenção do *status* redox celular. Quando adicionado ao sêmen de bode resultou em aumento da motilidade e redução de espermatozoides morfologicamente anormais depois da descongelação. Dessa forma, objetivou-se avaliar se a adição de ergotioneína e cisteamina ao meio BWB (Gibb et al., 2015), contendo uma associação de crioprotetores intra e extracelulares, seria capaz de aumentar os parâmetros de movimento espermático e a congelabilidade do sêmen de garanhões Mangalarga Marchador. Para a realização deste experimento foram coletados oito ejaculados de diferentes garanhões por meio de vagina artificial. O sêmen foi diluído 1:2 em meio à base de leite desnatado (BotuSêmen[®]), centrifugado utilizando 600 x g por 10 min. O pellet resultante da centrifugação foi rediluído para obter uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL nos diferentes diluidores testados para criopreservação de sêmen: D1) BotuCrio[®]; D2) BWB + 10% de LDL (lipoproteína de baixa densidade extraída da gema de ovo de galinha) + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; D3) BWB + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida + 5mM de ergotioneína; D4) BWB + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida + 5mM de cisteamina. O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL, devidamente identificadas e submetidas a criopreservação em sistema automatizado Neovet Cryogen HSE[®] portátil. A curva de refrigeração utilizada foi de -1°C por minuto até 5°C , seguido de tempo de equilíbrio de 1 minuto na temperatura de 5°C . Em seguida, as palhetas foram congeladas com taxa de $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na rampa 1 até a temperatura de -20°C e $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na rampa 2 até atingir -100°C , com posterior imersão e armazenamento das palhetas em nitrogênio líquido a -196°C . A descongelação foi realizada com imersão das palhetas em banho-maria a 46°C por 20 segundos. Os parâmetros de movimento espermático foram avaliados pelo SCA Evolution[®] (Veterinary edition, Barcelona, Espanha), depois do ajuste da concentração de leitura para 50×10^6 espermatozoides/mL. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso e foi utilizado ANOVA para testar as diferenças entre os diluidores e para comparações múltiplas de médias foi utilizada a função “Tukey C” do pacote “Tukey C”, versão 1.3-4. Quando os pressupostos não foram atendidos, mesmo com a transformação de dados, foi empregado um método estatístico não-paramétrico. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software R Core Team (2021) considerando um nível de significância de 5%. Os parâmetros analisados para identificar se o meio diluidor protegeu os espermatozoides durante a congelação e descongelação foram: motilidade (%), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m}/\text{s}$); velocidade média do trajeto (VAP; $\mu\text{m}/\text{s}$); velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m}/\text{s}$); retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). O uso do meio BWB para congelação de sêmen equino, utilizando a associação de crioprotetores intra e extracelulares apresentada acima, sem ou com adição dos antioxidantes ergotioneína e cisteamina não resultou em preservação dos parâmetros de movimento espermático quando comparado ao BotuCrio[®] ($P < 0,05$), exceto a velocidade curvilínea que foi semelhante entre o BotuCrio[®] e o BWB sem antioxidantes. Além da combinação crioprotetora não ter sido eficiente para manter os parâmetros de movimento espermático durante a criopreservação, podemos também chamar atenção para a concentração de antioxidantes utilizada e para a curva de congelação que podem não ter sido adequados para estes diluidores testados, sendo necessário mais estudos com diferentes concentrações e protocolos de congelação de forma a maximizar seu efeito de proteção aos espermatozoides. Diante dos resultados apresentados, concluímos que o meio BWB, sem ou contendo os antioxidantes ergotioneína e cisteamina na concentração de 5mM, não protege os parâmetros de movimento espermático importantes para garantir que os espermatozoides alcancem o local de fecundação no sistema genital feminino.

Palavras-chaves: Antioxidantes. Congelação. Espermatozoide. Garanhão.

Inclusion of ergothioneine and cysteamine in equine semen cryopreservation extender results in a significant reduction in sperm movement parameters

Larissa Rodrigues Santana¹, William Morais Machado¹, Bianca da Silva Abreu², Késsia Sheille Santos Mendes¹, Ivan Bezerra Allaman³, Paola Pereira das Neves Snoeck^{*1}

¹ Animal Reproduction Laboratory (LARA), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia, Brazil.

² Faculdade de Irecê, Irecê, Bahia, Brazil

³ Department of Exact Sciences (UESC)

*E-mail: paolasnoeck@uesc.br

Semen cryopreservation is a necessary process to ensure cellular survival for a prolonged period of time, but quite challenging for spermatozoa, as the reduction in temperature to -196 °C leads to changes in the plasma membrane, cellular dehydration, osmotic and oxidative stress, lesions in the DNA, in addition to injuries caused by the toxicity of intracellular cryoprotectants. In an attempt to minimize the stress that sperm undergo during freezing and thawing, different intra and extracellular cryoprotective substances are added to the diluting media. Antioxidants are used to protect sperm from possible injuries caused by oxidative stress that can result in lipid peroxidation. Ergothioneine is a natural hydrophilic amino acid, a nutrient and antioxidant that has been shown to scavenge reactive oxygen species. In addition to protecting sperm from chemicals derived from fructolysis, resulting in improved motility and DNA integrity after freezing and thawing. Cysteamine (2-aminoethanethiol), an aminothioliol antioxidant known to be an efficient hydroxyl radical scavenger, increases glutathione synthesis and may contribute to the maintenance of cellular redox status. When added to goat semen, it resulted in increased motility and a reduction in morphologically abnormal sperm after thawing. Therefore, the objective was to evaluate whether the addition of ergothioneine and cysteamine to the BWW medium (Gibb et al., 2015), containing an association of intra and extracellular cryoprotectants, would be able to increase sperm movement parameters and the freezability of semen from Mangalarga Marchador stallions. To carry out this experiment, eight ejaculates were collected from different stallions using an artificial vagina. The semen was diluted 1:2 in a skimmed milk-based medium (BotuCrio[®]), centrifuged using 2000 rpm for 10 min. The pellet resulting from centrifugation was re-diluted to obtain a final concentration of 100 x 10⁶ sperm/mL in the different extenders tested for semen cryopreservation: D1) BotuCrio[®]; D2) BWW + 10% LDL (low-density lipoprotein extracted from chicken egg yolk) + 2% glycerol + 3% dimethylformamide; D3) BWW + 10% LDL + 2% glycerol + 3% dimethylformamide + 5mM ergothioneine; D4) BWW + 10% LDL + 2% glycerol + 3% dimethylformamide + 5mM cysteamine. The diluted semen was packaged in 0.5 mL straws, duly identified and subjected to cryopreservation in a portable Neovet Cryogen HSE[®] automated system. The cooling curve used was -1 °C per minute to 5 °C, followed by an equilibrium time of 1 minute at a temperature of 5 °C. Then, the straws were frozen at a rate of -30°C/min in ramp 1 to a temperature of -20 °C and -30 °C/min in ramp 2 until reaching -100 °C, with subsequent immersion and storage of the straws in liquid nitrogen at -196 °C. Defrosting was carried out by immersing the straws in a water bath at 46 °C for 20 seconds. Sperm movement parameters were evaluated by SCA Evolution[®] (Veterinary edition, Barcelona, Spain), after adjusting the reading concentration to 50 x 10⁶ sperm/mL. The experimental design was in randomized blocks and ANOVA was used to test differences between extenders and for multiple comparisons of means the “Tukey C” function of the “Tukey C” package, version 1.3-4, was used. When the assumptions were not met, even with data transformation, a non-parametric statistical method was used. All statistical analyzes were carried out using the R Core Team software (2021) considering a significance level of 5%. The parameters analyzed to identify whether the extender medium protected sperm during freezing and thawing were: motility (%), curvilinear velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$); average path velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$); progressive linear velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$); straightness (STR; %) and linearity (LIN; %). The use of BWW medium for freezing equine semen, using the combination of intra and extracellular cryoprotectants presented above, without or with the addition of the antioxidants ergothioneine and cysteamine, did not result in preservation of sperm movement parameters when compared to BotuCrio[®] ($P < 0.05$), except the curvilinear velocity which was similar between BotuCrio[®] and BWW without antioxidants. In addition to the cryoprotective combination not being efficient in maintaining sperm movement parameters during cryopreservation, we can also draw attention to the concentration of antioxidants used and the freezing curve, which may not have been suitable for these extenders tested, requiring further studies with different concentrations and freezing protocols in order to maximize their sperm protection effect. Given the results presented, we conclude that the BWW medium, without or containing the antioxidants ergothioneine and cysteamine at a concentration of 5mM, does not protect sperm movement parameters that are important to ensure that sperm reach the fertilization site in the female genital system.

Keywords: Antioxidants. Freezing. Sperm. Stallion.

Correlação da morfologia espermática com a taxa de recuperação embrionária no uso de inseminação artificial com sêmen refrigerado em equinos

Eligiane Priscila Meurer¹, Teresinha Inês Assumpção¹, Pedro Sanches Oquendo Junior², Fabiana Maddalena de Gaspari Oquendo², Danyessa Silva Santos², Renata Lançoni^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil²
Gallop Medicina Veterinária Equina, Uberlândia, MG, Brasil

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

Equinos foram primordialmente selecionados quanto as aptidões e características fenotípicas e isto contribuiu para menor fertilidade entre estes animais. A avaliação da morfologia espermática é o componente do espermograma que melhor se correlaciona com a fertilidade do garanhão. Atualmente as biotécnicas de reprodução, como a inseminação artificial (IA), vem otimizando a distribuição de material genético por longas distâncias, no entanto também enfrentam desafios quanto a qualidade seminal de uma parcela importante de garanhões. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da morfologia espermática na taxa de recuperação embrionária com uso de sêmen refrigerado de garanhões. Para isso, foram recebidas 49 amostras de sêmen fixado em formol salina a 4% e realizadas análises de morfologia espermática. Foi utilizada a técnica de preparação úmida e microscopia de contraste de fase, foram contabilizadas 200 células por amostra de sêmen e classificadas quanto aos defeitos morfológicos maiores, menores e totais. Os resultados das análises de morfologia espermática foram correlacionados (teste de correlação de Pearson) com a taxa de recuperação embrionária após IA. O valor de $P \leq 0,05$ foi considerado como diferença significativa. Não foram encontradas correlações significativas entre a quantidade de defeitos morfológicos e a taxa de recuperação embrionária. Porém, foram encontradas correlações entre defeitos morfológicos, como: gota citoplasmática proximal e gota citoplasmática distal ($r = 0,62$ e $p < 0,0001$), cabeça isolada patológica e cabeça isolada normal ($r = 0,63$ e $p < 0,0001$), e por último, alteração no acrossoma correlacionado as alterações de cabeça como delgada, gigante, pequena, curta e larga ($r = 0,82$ e $p < 0,0001$). Dois garanhões apresentaram alta fertilidade (70% e 80%) e elevada porcentagem de defeitos morfológicos no sêmen (defeitos totais = 59%, defeitos maiores = 45% e defeitos totais = 34%, defeitos maiores = 29%, respectivamente), podendo ser explicado pela presença de defeitos compensáveis. Diante dos resultados observados neste estudo, é possível concluir que os defeitos morfológicos encontrados nos garanhões avaliados não influenciaram na taxa de recuperação embrionária das éguas inseminadas.

Palavras-chave: garanhões; avaliação espermática; fertilidade; biotécnicas da reprodução.

Agradecimentos: a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pela participação no Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (EDITAL N^o 7/2022 PIBIC- FAPEMIG)

Correlation of sperm morphology with embryo recovery rate in the use of artificial insemination with cooled sperm in horses

Eligiane Priscila Meurer¹, Teresinha Inês Assumpção¹, Pedro Sanches Oquendo Junior², Fabiana Maddalena de Gaspari Oquendo², Danyessa Silva Santos², Renata Lançoni^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU), Uberlândia, MG, Brasil. ² Gallop Medicina Veterinária Equina, Uberlândia, MG, Brasil

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

Equines were primarily selected for their abilities and phenotypic characteristics and this contributed to lower fertility among these animals. The evaluation of sperm morphology is the component of the spermogram that best correlates with the fertility of the stallion. Currently, the reproduction biotechniques such as artificial insemination (AI) have been optimizing the distribution of genetic material over long distances, however, it also faces challenges regarding the seminal quality of an important portion of stallions. Therefore, the objective of this study was to evaluate the impact of sperm morphology with embryo recovery rate using cooled sperm in stallions. For this purpose, 49 sperm sample fixed in 4% saline formalina were received and sperm morphology analyses were performed. Using the wet preparation technique and phase contrast microscopy, 200 cells were counted per semen sample and classified according to major, minor and, total morphological defects. The results of sperm morphology analyses were correlated (Pearson Correlation Test) with the embryo recovery rate after AI. A P-value of $\leq 0,05$ was considered significant. No significant correlations were found between the quantity of morphological defects and the embryo recovery rate. However, correlations were found between morphological defects, such as: proximal droplets and distal droplets ($r = 0,62$ e $p < 0,0001$), pathological tailless heads and tailless heads ($r = 0,63$ e $p < 0,0001$), and finally, alteration in the correlated acrosome such as head changes such as narrow, giant, small, short broad and large ($r = 0,82$ e $p < 0,0001$). Two stallions showed high fertility (70% and 80%) and a high percentage of morphological defects in the sperm (total defects = 59%, major defects = 45% and total defects = 34%, major defects = 29%, respectively), which can be explained by the presence of compensable defects. Based on the results observed in this study, it is possible to conclude that the morphological defects found in the evaluated stallions did not influence the embryo recovery rate of the inseminated mares.

Keys-Words: stallions; sperm evaluation; fertility; reproduction biotechniques.

Acknowledgments: The Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais for participation in the Institutional Program for Scientific Initiation Scholarships (EDITAL N0 7/2022 PIBIC- FAPEMIG).

Segurança da aplicação de células troncos mesenquimais alogênicas no parênquima testicular de equinos jovens – resultados preliminares

Paula Caroline Pereira¹, Vitória Caroline Abdalla de Mendonça Siqueira², Maurício Antonio Silva Peixer², Marcelo da Cunha Xavier², Patricia Furtado Malard³, Hilana dos Santos Sena Brunel⁴, Denise Pereira Leme⁵, Renata Lanconi^{3*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

²Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, Brasil

³Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil

⁴BIO CELL Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

⁵Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

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

O efeito terapêutico promissor das células-tronco mesenquimais (CTM) alogênicas vem sendo observado em diversos setores da medicina veterinária incluindo o campo reprodutivo. Tal efeito é atribuído à sua capacidade de produzir citocinas, fatores de crescimento e outras quimiocinas, que tem efeitos parácrinos no tecido, desempenhando um papel importante na imunomodulação, contribuindo assim para a recuperação e regeneração de outros tipos de células e tecidos do organismo, sendo um potencial tratamento de patologias testiculares em equinos. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito e a segurança da aplicação das CTMs alogênicas, derivadas de tecido adiposo, no parênquima testicular de equinos jovens. Para isto foram utilizados, até o momento, 7 animais jovens, com idade entre 2 e 7 anos de raças variadas na região de Uberlândia MG. Foi realizada uma aplicação intra-testicular de 3 ml com 3×10^6 de CTMs no testículo direito de cada animal, considerando este então o grupo tratado, logo os testículos esquerdos, sem aplicação, o grupo controle. Não foi realizada aplicação de nenhuma substância do grupo controle, pois foi considerado que o parênquima testicular é complexo e sensível e qualquer substância de diluição das células (como PBS) poderia induzir uma degeneração testicular, impossibilitando a comparação dos tecidos. Após 20 dias da aplicação, os animais foram orquiequimizados e nos corpos dos testículos realizaram-se, com bisturi, cortes transversais, com 0,5 cm de espessura entre eles sem seccioná-los por completo e em seguida foram mantidos em formol tamponado a 10%, posteriormente em álcool 70%, e por fim, inclusos em parafina. Para a avaliação histopatológica, os blocos de tecidos foram cortados em micrótomo na espessura de 5 μ m, esses fragmentos foram colocados sobre lâmina e corados por hematoxilina e eosina. Para avaliação, cada lâmina foi dividida por 4 quadrantes e cada quadrante recebeu uma nota por escore de 0 a 3, sendo 0-ausência, 1-leve, 2-moderado e 3-intenso, sendo as variáveis avaliadas a presença de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero, hemorragia, a quantidade de vasos, presença de edema, vacúolos e infiltrado inflamatório. Em seguida, foi feita a média das notas dos quadrantes para análise descritiva e comparação dos grupos. No grupo controle, 66,67% das amostras apresentaram escore 1 para presença de espermatozoides e 33,3% escore 2, já 33,3% do grupo tratado apresentou escore 1; 50% escore 2; 16,7% apresentaram escore 3, mostrando que o grupo tratado com CTM apresentou maior quantidade de espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero. Já na avaliação da hemorragia do grupo controle 83,3% das amostras apresentaram escore 0 e 16,7% escore 1, em contrapartida 50% do grupo tratado apresentou escore 0, 33,3% escore 1 e 16,7% escore 3. Registrou-se que 50% das amostras do grupo controle apresentaram escore 0 para quantidade de vasos e 50% escore 1, já no grupo tratado registrou-se 33,3% escore 1 e 66,7% escore 2, estes dois resultados corroboram com a hipótese de que as CTM induzem a angiogênese no tecido. Com relação ao edema 16,7% do grupo controle apresentou escore 0; 16,7% escore 1; 33,3% escore 2 e 33,3% escore 3, no grupo tratado o edema foi de 16,7% para os escores 1; 66,7% escore 2 e 16,7% escore 3. Na avaliação dos vacúolos 33,3% do grupo controle apresentou escore 2 e 66,7% escore 3, já no grupo tratado o resultado foi de 16,7% das amostras apresentaram escore 2 e 83,3% escore 3. Nos dois grupos foram observados quantidade similar de vacúolos, o que pode estar relacionado com a idade dos animais e imaturidade do parênquima testicular. Por fim, o infiltrado inflamatório foi de 33,3% para os escores 1, 2 e 3 tanto para o grupo controle quanto para o grupo tratado. De acordo com o observado até o momento, podemos concluir que a aplicação de CTM em parênquima testicular equino é segura, pois nenhum animal apresentou reação adversa ou exacerbada e que o tratamento sugere possível aceleração da maturidade sexual devido a maior quantidade de túbulos seminíferos com espermatozoides no grupo tratado. Além disso, observou-se também maior quantidade de vasos sanguíneos no grupo tratado, corroborando com a ação angiogênica das CTM.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; eficiência reprodutiva; ganhão; testículo.

Safety of the application of allogeneic mesenchymal stem cells in the testicular parenchyma of young horses - preliminary results

Paula Caroline Pereira¹, Vitória Caroline Abdalla de Mendonça Siqueira², Maurício Antonio Silva Peixer², Marcelo da Cunha Xavier², Patricia Furtado Malard³, Hilana dos Santos Sena Brunel⁴, Denise Pereira Leme⁵, Renata Lanconi^{3*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

²Bio Biotecnologia da Reprodução Animal, Brasília, DF, Brasil

³Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brasil

⁴BIO CELL Terapia Celular, Brasília, DF, Brasil

⁵Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

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

The promising therapeutic effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) has been observed in various sectors of veterinary medicine, including the reproductive field. This effect is attributed to their ability to produce cytokines, growth factors and other chemokines, which have paracrine effects on the tissue, playing an important role in immunomodulation, thus contributing to the recovery and regeneration of other types of cells and tissues in the body, making them a potential treatment for testicular pathologies in horses. The aim of this study is to evaluate the effect and safety of applying allogeneic MSCs derived from adipose tissue to the testicular parenchyma of young horses. To this end, 7 young animals aged between 2 and 7 years of varying breeds in the region of Uberlândia MG have been used so far. An intra-testicular application of 3 ml with 3×10^6 of MSCs was made to the right testicle of each animal, which was then considered the treated group, while the left testicles, which were not treated, were considered the control group. No substance was applied to the control group, as it was considered that the testicular parenchyma is complex and sensitive and any substance to dilute the cells (such as PBS) could induce testicular degeneration, making it impossible to compare the tissues. Twenty days after the application, the animals were orchidectomized and transverse cuts were made in the testicular bodies using a scalpel, with a thickness of 0.5 cm between them without completely sectioning them. They were then kept in 10% buffered formalin, then 70% alcohol and finally embedded in paraffin. For the histopathological evaluation, the tissue blocks were cut with a microtome to a thickness of 5 μm , these fragments were placed on a slide and stained with hematoxylin and eosin. For evaluation, each slide was divided into 4 quadrants and each quadrant was given a score from 0 to 4, 0-absent, 1-mild, 2-moderate and 3-intense, with the variables evaluated being the presence of sperm in the lumen of the seminiferous tubule, hemorrhage, the number of vessels, the presence of edema, vacuoles and inflammatory infiltrate. The average of the quadrant scores was then calculated for descriptive analysis and comparison of the groups. In the control group, 66.67% of the samples had a score of 1 for the presence of sperm and 33.3% had a score of 2, while 33.3% of the treated group had a score of 1; 50% had a score of 2; 16.7% had a score of 3, showing that the group treated with MSC had a greater quantity of sperm in the lumen of the seminiferous tubule. In the assessment of bleeding in the control group, 83.3% of the samples had a score of 0 and 16.7% had a score of 1. In contrast, 50% of the treated group had a score of 0, 33.3% had a score of 1 and 16.7% had a score of 3. 50% of the samples in the control group had a score of 0 for the number of vessels and 50% had a score of 1. In the treated group, 33.3% had a score of 1 and 66.7% had a score of 2. These two results corroborate the hypothesis that MSCs induce angiogenesis in the tissue. With regard to edema, 16.7% of the control group had a score of 0; 16.7% had a score of 1; 33.3% had a score of 2 and 33.3% had a score of 3. In the treated group, edema was 16.7% for score 1; 66.7% had a score of 2 and 16.7% had a score of 3. In the assessment of vacuoles, 33.3% of the control group had a score of 2 and 66.7% had a score of 3, while in the treated group 16.7% of the samples had a score of 2 and 83.3% had a score of 3. A similar number of vacuoles were observed in both groups, which may be related to the age of the animals and the immaturity of the testicular parenchyma. Finally, the inflammatory infiltrate was 33.3% for scores 1, 2 and 3 for both the control and treated groups. According to what has been observed so far, we can conclude that the application of MSC to equine testicular parenchyma is safe, as no animal showed an adverse or exacerbated reaction and that the treatment suggests a possible acceleration of sexual maturity due to the greater number of seminiferous tubules with sperm in the treated group. In addition, a greater number of blood vessels were observed in the treated group, corroborating the angiogenic action of MSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells; reproductive efficiency; stallion; testicle.

Avaliação da ozonioterapia sistêmica sobre o estresse oxidativo e qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Luis Felipe Pereira da Silva Oliveira^{1*}, Isabelle Trezze Marins Magalhães², Hannah Garcia Fontes³, Giovanna Brito Almeida³, Breno Fernando Martins de Almeida⁴, André Luís Rios Rodrigues⁵, Aline Emerim Pinna^{5*}

¹ Pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal), UFF, Niterói, RJ, Brasil

²Médica veterinária, Niterói, RJ, Brasil

³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense

⁴Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos (Unifio)

⁵Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, UFF, Niterói, RJ, Brasil

*e-mail: luisfpsoliveira@gmail.com/aepinna@id.uff.br

O desenvolvimento da equinocultura tem relação direta com o desempenho reprodutivo, visto que o lucro da atividade depende da venda de animais, tornando a fertilidade do garanhão essencial para seu sucesso. O exame andrológico reflete as condições reprodutivas do garanhão e, nesse exame, pode-se, inclusive, avaliar o status de estresse oxidativo do animal. Dessa forma, a modulação do estresse oxidativo sistêmico por meio da ozonioterapia, técnica empregada com frequência para resolução de feridas e preparo de animais para eventos esportivos, poderia influenciar indiretamente no sêmen equino e, conseqüentemente, na reprodução. Diante dessa hipótese, o presente estudo avaliou os efeitos da ozonioterapia sistêmica sobre a saúde clínica, estresse oxidativo e qualidade seminal de garanhões hípidos durante 3 semanas antes do tratamento, 3 semanas durante o tratamento e 10 semanas posteriores ao tratamento com insuflação retal de gás ozônio, totalizando 16 semanas de avaliações. Foram utilizados três garanhões da raça Mangalarga Marchador, em rotina de coleta de sêmen em dias alternados, localizados em propriedade rural município de Maricá, estado do Rio de Janeiro, latitude -22° 86' 14" Sul, longitude -42° 75' 64" Oeste. No período de março a julho, foram submetidos a um tratamento com ozonioterapia sistêmica, administrado por via retal durante 3 semanas, em 10 aplicações de 1L em concentrações crescentes de 10µ/mL nas duas primeiras aplicações, 15µ/mL nas duas subsequentes e 22µ/mL nas seis subsequentes. Realizou-se dosagens de marcadores de estresse oxidativo no soro do sangue e no plasma seminal - capacidade antioxidante total (CAT), capacidade antioxidante total pela redução do cátion ABTS (CAT-ABTS), redução do cátion ABTS associado à peroxidase (CAT-ABTS+HRP) redução cúprica (CAT-CUPRAC), redução férrica (CAT-FRAP), capacidade oxidante total (COT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), albumina e ácido úrico. Foram avaliados parâmetros de cinética espermática (motilidade e vigor) e patologias espermáticas, além de exames físicos nos quais avaliou-se frequências cardíaca e respiratória, motilidade intestinal, coloração de mucosas, temperatura retal e tempo de preenchimento capilar, encontrados dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie. Todas essas coletas e avaliações foram feitas semanalmente durante todo o período experimental. Os animais foram comparados consigo mesmos e foi realizado o teste de correlação de Spearman entre os parâmetros analisados. COT, marcador de estresse oxidativo, elevou-se no plasma seminal dos três animais durante e após o tratamento. Em relação aos marcadores de resposta antioxidante, CAT-FRAP elevou-se no soro do sangue dos três animais em momentos pontuais durante e após o fim do protocolo de ozonioterapia empregado. As outras análises utilizadas para avaliar estresse oxidativo nesses animais comportaram-se de forma variada, isto é, apresentaram padrões diversos nos diferentes animais, tanto no soro do sangue quanto no plasma seminal. Não foram observadas alterações nos parâmetros clínicos ou do sêmen, assim como também não foram encontradas correlações entre a qualidade seminal e o estresse oxidativo no plasma seminal. Conclui-se que o protocolo utilizado pode ter sido eficaz em gerar estresse oxidativo transitório, provocando resposta antioxidante no soro do sangue sem prejudicar a saúde geral ou parâmetros espermáticos avaliados.

Palavras-chave: Garanhões, oxidação, ozônio, sêmen, antioxidantes

Agradecimentos: à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e à toda equipe do Haras Silvano.

Evaluation of systemic ozone therapy on oxidative stress and seminal quality of Mangalarga Marchador stallions

Luis Felipe Pereira da Silva Oliveira^{1*}, Isabelle Trezze Marins Magalhães², Hannah Garcia Fontes³, Giovanna Brito Almeida³, Breno Fernando Martins de Almeida⁴, André Luís Rios Rodrigues⁵, Aline Emerim Pinna^{5*}

¹ Pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal), UFF, Niterói, RJ, Brasil

² Médica veterinária, Niterói, RJ, Brasil

³ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense

⁴ Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos (Unifio)

⁵ Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, UFF, Niterói, RJ, Brasil

*e-mail: luisfpsoliveira@gmail.com/aepinna@id.uff.br

The development of equine breeding is directly related to reproductive performance, given that the profit of the activity depends on the sale of animals, making the stallion's fertility essential for its success. The andrological examination reflects the reproductive conditions of the stallion and, in this examination, it is possible to evaluate the animal's oxidative stress status. Thus, the modulation of systemic oxidative stress through ozone therapy, a technique frequently used for wound resolution and preparation of animals for sporting events, could indirectly influence equine semen and, consequently, reproduction. In view of this hypothesis, the present study evaluated the effects of systemic ozone therapy on the clinical health, oxidative stress, and seminal quality of healthy stallions for 3 weeks before treatment, 3 weeks during treatment, and 10 weeks after treatment with rectal insufflation of ozone gas, totaling 16 weeks of evaluations. Three Mangalarga Marchador breed stallions, undergoing semen collection on alternate days, located on a rural property in the municipality of Maricá, state of Rio de Janeiro, latitude -22° 86' 14'' South, longitude -42° 75' 64'' West, were used. From March to July, they underwent systemic ozone therapy treatment, administered rectally for 3 weeks, in 10 applications of 1L at increasing concentrations of 10µ/mL in the first two applications, 15µ/mL in the subsequent two, and 22µ/mL in the remaining six. Measurements of oxidative stress markers were performed in blood serum and seminal plasma - total antioxidant capacity (TAC), total antioxidant capacity by ABTS cation reduction (TAC-ABTS), ABTS cation reduction associated with peroxidase (TAC-ABTS+HRP), cupric reduction (TAC-CUPRAC), ferric reduction (TAC-FRAP), total oxidant capacity (TOC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), albumin, and uric acid. Sperm kinetic parameters (motility and vigor) and spermatid pathologies were evaluated, as well as physical examinations assessing heart and respiratory rates, intestinal motility, mucosal coloration, rectal temperature, and capillary refill time, all found within normal parameters for the species. All these collections and evaluations were performed weekly throughout the experimental period. The animals were compared with themselves, and the Spearman correlation test was performed between the analyzed parameters. TOC, an oxidative stress marker, increased in the seminal plasma of all three animals during and after treatment. Regarding antioxidant response markers, TAC-FRAP increased in the blood serum of all three animals at specific moments during and after the end of the ozone therapy protocol employed. The other analyses used to evaluate oxidative stress in these animals behaved variably, i.e., they presented different patterns in different animals, both in blood serum and seminal plasma. No changes were observed in clinical or semen parameters, nor were correlations found between seminal quality and oxidative stress in seminal plasma. It is concluded that the protocol used may have been effective in generating transient oxidative stress, causing an antioxidant response in blood serum without impairing overall health or evaluated sperm parameters.

Keywords: Stallions, oxidation, ozone, semen, antioxidants

Acknowledgments: to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and to the whole staff at Haras Silvado.

Métodos para estocagem dos espermatozoides do epididímo de garanhões

Julia Quental Caribé¹, Thawan Santana Piemonte¹, Ken Kawaoka Nagai¹, Raphaela Gabrielle Brito Sousa¹,
Henrique Thomazo Frias¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Marcilio Nichi^{1*}

¹ Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo
*e-mail: mnichi@usp.br

Atualmente, são empregados numerosos processos biotecnológicos com o intuito de preservar e maximizar o material genético de um animal. A colheita de espermatozoides epididimários tem sido uma alternativa em situações onde o animal vem a óbito ou após a orquiectomia. Entretanto, essa prática exige, além de conhecimentos de manipulação, cuidados para a obtenção do epidídimo e o correto armazenamento. O tempo de recuperação desses espermatozoides influencia diretamente na qualidade destas células, refletida na cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e suscetibilidade à peroxidação lipídica. Diante disso, foram coletados complexos testículo-epidídimo de 10 animais (totalizando 20 testículos) de orquiectomias eletivas visando comparar a qualidade pós-descongelamento de espermatozoides epididimários armazenados a 5°C durante 24 horas, *in vivo* (ou seja, no próprio complexo testículo-epidídimo) ou *in vitro* (ou seja, em diluidor à base de leite desnatado disponível comercialmente). Os complexos de cada animal foram mantidos em isopor com gelo até a chegada ao laboratório, onde foram designados aleatoriamente em grupos Diluidor e Testículo. O complexo testículo-epidídimo do grupo Diluidor foi coletado em até 2 horas após a orquiectomia, diluído em diluidor comercial BotuSêmen® e submetido à refrigeração a 5°C por 24 horas, seguido pela colheita de espermatozoides. Posteriormente, as amostras que possuíram motilidade superior a 40% foram criopreservadas. Foi realizada análise da cinética espermática (CASA) logo após a coleta (fresco) e após a refrigeração tanto no diluidor quanto no testículo. Após no mínimo 1 semana, foi feito o descongelamento e foram avaliadas a cinética espermática, a integridade de membrana plasmática e acrossomal (eosina-nigrosina e fast green/rosa bengala, respectivamente), a atividade mitocondrial (3'3 Diaminobenzina – Teste DAB) e a suscetibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica (ensaio TBARS). Os dados foram analisados utilizando o software estatístico SAS *System for Windows*, desenvolvido pela SAS Institute Inc. de Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$), indicando que diferenças consideradas estatisticamente significativas seriam aquelas em que a probabilidade de ocorrência ao acaso fosse menor que 5%. A análise descritiva incluiu o cálculo das médias, bem como a avaliação da variabilidade em torno dessas médias por meio do erro padrão, que representa a variação esperada das médias em diferentes amostragens da mesma população. Foi possível obter testículos de 10 cavalos (totalizando 20 testículos), sendo que apenas 3 cavalos apresentaram espermatozoides epididimários com qualidade mínima de 40% de motilidade para serem congelados após as 24 horas de refrigeração ($p < 0,05$). No entanto, houve uma maior porcentagem de células com alto comprometimento mitocondrial (DAB III) e uma maior suscetibilidade à peroxidação lipídica (TBARS) no grupo que ficou refrigerado no testículo ($p < 0,05$). Na análise do sêmen fresco e pré-congelamento, verificou-se uma menor amplitude de movimento lateral da cabeça e uma maior porcentagem de espermatozoides lentos nas amostras epididimárias imediatamente após a coleta em relação aos refrigerados no testículo por 24 horas. Houve uma maior frequência de batimento cruzado e uma maior porcentagem de células estáticas nas amostras refrigeradas no testículo (62.8 ± 3.3^a) em relação às amostras frescas (42.2 ± 4.9^b) e às refrigeradas no diluidor (47.1 ± 4.5^b). O presente estudo demonstrou que os espermatozoides armazenados no complexo testículo-epidídimo tiveram uma piora em alguns parâmetros em relação àqueles armazenados em diluidor comercial pelo mesmo período. Havendo a necessidade de refrigeração dos espermatozoides epididimários antes de seu uso, é interessante que sejam coletados e armazenados em diluidor comercial, para preservar seus parâmetros por um tempo maior, garantindo melhores índices reprodutivos quando utilizados. Os resultados sugerem que houve uma diminuição da qualidade nos espermatozoides que ficaram refrigerados no complexo testículo-epidídimo em relação àqueles que ficaram no diluidor comercial BotuSêmen®. Com isso, concluímos que, em casos em que o animal precise passar por uma orquiectomia ou em casos de óbito, a coleta dos espermatozoides epididimários deve ser feita o mais rápido possível para garantir melhor qualidade e índices reprodutivos.

Palavras-chave: cinética espermática. complexo testículo-epidídimo. diluidor. equus caballus. peroxidação lipídica.

Methods for storing sperm from the epididymis of stallions

Julia Quental Caribé¹, Thawan Santana Piemonte¹, Ken Kawaoka Nagai¹, Raphaela Gabrielle Brito Sousa¹,
Henrique Thomazo Frias¹, Álvaro de Miranda Alves¹, Marcilio Nichi^{1*}

¹ Department of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, University of São Paulo
*e-mail: mnichi@usp.br

Currently, numerous biotechnological processes are used with the aim of preserving and maximizing the genetic material of an animal. The harvesting of epididymal sperm has been an alternative in situations where the animal dies or post-orchietomy. However, in addition to manipulation knowledge, it requires care for obtaining the epididymis and correct storage; the recovery time of these sperm directly influences the quality of these cells, such as sperm kinetics, plasma membrane and acrosome integrity, mitochondrial activity, and susceptibility to lipid peroxidation. Therefore, testicle-epididymis complexes were collected from 10 animals (20 testicles) undergoing elective orchietomies to compare the post-thaw quality of epididymal sperm stored at 5°C for 24 hours, *in vivo* (i.e., in the testicle-epididymis complex itself) or *in vitro* (i.e., in commercially available skim milk-based diluent). The complexes of each animal were kept in Styrofoam with ice until arrival at the laboratory, where they were randomly assigned to Dilutor and Testicle groups. The testicle-epididymis complex from the Dilutor group was collected within 2 hours after orchietomy, diluted in BotuSêmen[®] commercial diluent, and refrigerated at 5°C for 24 hours, followed by sperm harvesting. Subsequently, samples with motility greater than 40% were cryopreserved. Sperm kinetics analysis (CASA) was performed immediately after collection (fresh) and after refrigeration in both diluent and testicle. After a minimum of 1 week, thawing was performed, and sperm kinetics, plasma membrane and acrosomal integrity (eosin-nigrosin and fast green/rosa bengal, respectively), mitochondrial activity (3'3 Diaminobenzidine - DAB Test), and sperm susceptibility to lipid peroxidation (TBARS assay) were evaluated. The data were analyzed using the statistical software SAS System for Windows, developed by SAS Institute Inc. from Cary, North Carolina, USA. The significance level adopted was 5% ($p < 0.05$), indicating that statistically significant differences were those in which the probability of random occurrence was less than 5%. Descriptive analysis included calculating means and evaluating variability around these means through standard error, representing the expected variation of means in different samples from the same population. It was possible to obtain testicles from 10 horses (20 testicles in total), of which only 3 horses had epididymal sperm with a minimum quality of 40% motility to be frozen after 24 hours of refrigeration ($p < 0.05$). However, there was a higher percentage of cells with high mitochondrial compromise (DAB III) and greater susceptibility to lipid peroxidation (TBARS) in the group refrigerated in the testicle ($p < 0.05$). In the analysis of fresh semen and pre-freezing, a smaller lateral head movement amplitude and a higher percentage of slow sperm were observed in epididymal samples immediately after collection compared to those refrigerated in the testicle for 24 hours. There was a higher frequency of cross-beating and a higher percentage of static cells in samples refrigerated in the testicle (62.8 ± 3.3^a) compared to fresh samples (42.2 ± 4.9^b) and those refrigerated in the diluent (47.1 ± 4.5^b). This study showed that sperm stored in the testicle-epididymis complex worsened in some parameters compared to those stored in commercial diluent for the same period. If refrigeration of epididymal sperm before use is necessary, it is interesting to collect and store them in commercial diluent to preserve their parameters for a longer time, ensuring better reproductive indices when used. The results suggest a decrease in quality in sperm refrigerated in the testicle-epididymis complex compared to those in the commercial BotuSêmen[®] diluent. Therefore, we conclude that in cases where the animal needs to undergo an orchietomy or in cases of death, the collection of epididymal sperm should be done as quickly as possible to ensure better quality and reproductive indices.

Keywords: diluent. equus caballus. lipid peroxidation. sperm kinetics. testis-epididymis complex.