



PAULA GOMES RODRIGUES

**QUALIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES
MANGALARGA MARCHADOR: INFLUÊNCIA
DA IDADE, PESO E SUPLEMENTAÇÃO
COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS
ÔMEGA 3**

LAVRAS – MG

2013

PAULA GOMES RODRIGUES

**QUALIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES MANGALARGA
MARCHADOR: INFLUÊNCIA DA IDADE, PESO E SUPLEMENTAÇÃO
COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA 3**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes, para obtenção do título de Doutor.

Orientador

PhD. José Camisão de Souza

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Rodrigues, Paula Gomes.

Qualidade espermática de garanhões Mangalarga Marchador :
influência da idade, peso e suplementação com ácidos graxos
poliinsaturados ômega 3 / Paula Gomes Rodrigues. – Lavras :
UFLA, 2013.

85 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: José Camisão de Souza.

Bibliografia.

1. Equinos. 2. Puberdade. 3. Motilidade espermática. 4. Ácido
linolênico. 5. Criopreservação. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 636.10824

PAULA GOMES RODRIGUES

**QUALIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES MANGALARGA
MARCHADOR: INFLUÊNCIA DA IDADE, PESO E SUPLEMENTAÇÃO
COM ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS ÔMEGA 3**

APROVADA em 14 de março de 2013.

Dr. Antônio Gilberto Bertechini	UFLA
Dra. Raquel Silva de Moura	UFLA
Dr. Raimundo Vicente de Sousa	UFLA
Dr. Álvaro Mendes de Resende	PUC-BH

PhD. José Camisão de Souza

Orientador

LAVRAS- MG

2013

À minha família que sempre esteve do meu lado me apoiando e me dando forças para seguir em frente, me aconselhando e respeitando, sempre torcendo pelo meu sucesso.

Ao professor José Camisão de Souza, pela dedicação, paciência, amizade e por passar conselhos, pessoais e profissionais, de valor inestimável. Mais que um professor, um grande amigo que terei pela vida toda.

Aos amigos que compartilham a paixão pelo cavalo, capazes de passar horas inteiras apenas conversando e admirando este nobre e maravilhoso animal.

A todos os amigos de graduação e Pós-Graduação, cada um de vocês será lembrado por mim com muito amor e carinho, pois a amizade verdadeira continua, independente da distância....

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pelos conhecimentos transmitidos e boa convivência ao longo da graduação e Pós-Graduação.

Ao Haras El Far e Haras do Henrique por cederem os ganhões para o experimento.

Ao Grupo de Estudos em Reprodução Animal, pela ajuda indispensável para realização deste trabalho.

Aos professores Antônio Gilberto Bertechini, Raquel Silva de Moura, Raymundo Vicente de Sousa e Álvaro Mendes de Resende, por participarem da banca de defesa da tese contribuindo com o aperfeiçoamento deste trabalho.

“Não deem dinheiro aos seus filhos. Se puderem deem-lhes cavalos. A equitação nunca arrastou ninguém à desonra. Nenhuma hora de vida passada numa sela é perdida. Muitos jovens têm se arruinado possuindo cavalos, apostando em cavalos, mas nunca montando um cavalo.”

(Sir Winston Churchill)

RESUMO

O objetivo foi avaliar a influência da suplementação dietética com ômega-3, peso, escore de condição corporal (ECC) e idade de garanhões Mangalarga Marchador na qualidade do sêmen fresco, resfriado e congelado. Foram utilizados 20 garanhões (3,5 a 15 anos; $389,7 \pm 39,7$ kg) distribuídos aleatoriamente nos tratamentos: suplementação com 150 mL de óleo enriquecido com ômega-3 (n=10 animais) e sem suplementação (n= 10 animais). O sêmen foi coletado a cada quinze dias durante 60 dias, totalizando cinco coletas por garanhão (n= 100 amostras). As características seminais avaliadas foram: motilidade, vigor, viabilidade, morfologia, teste de resistência osmótica (TRO), e peroxidação lipídica da membrana plasmática. Foram feitas avaliações no sêmen fresco, 2, 6, 12 e 24h após resfriamento e 24 h após congelamento. O peso foi estimado por meio de fita e o ECC foi avaliado com base em uma escala de 1-9. Os efeitos fixos do tratamento, peso, idade, ECC e das amostras foram submetidos ao Procedimento Misto do SAS[®] e as médias foram comparadas por contrastes ortogonais. O vigor espermático foi maior em animais com mais de quatro anos de idade e o índice de defeitos morfológicos foi menor em animais pesando mais de 400 kg. No sêmen fresco, a motilidade foi maior em garanhões suplementados. No sêmen congelado, a motilidade, motilidade progressiva, vigor e TRO foram superiores nos animais suplementados. Em conclusão, a utilização de animais com mais de quatro anos de idade e peso acima de 400 kg e, aliado a isto, a adição de ômega-3 na dieta aumenta a motilidade e vigor espermáticos no sêmen fresco e congelado, maximizando sua qualidade.

Palavras-chave: Ácido linolênico. Criopreservação. Motilidade espermática. Puberdade.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the influence of omega-3 supplementation, body condition score (BCS) weight and age on the quality of fresh, cooled and frozen-thawed Mangalarga Marchador stallion semen. Ten stallions were used (3.5 to 15 years-old; 389 ± 39.7 kg) allocated randomly to the following treatments: 150 mL of omega-3 enriched oil (n=10) and no supplementation (n=10). Stallions were switched over in the treatments after a 20 day interval. Semen was collected every fifteen days during 60 days, for a total of five samples per animal (n= 100 samples). The following seminal characteristics were evaluated: motility, vigor, viability, morphology, osmotic tolerance test (OTT), and lipid peroxidation of the plasma membrane. Semen was evaluated upon sampling and at 2, 6, 12 and 24 hours after cooling and 24 hours after freezing. Body weight was estimated at heart girth by means of a commercial tape and the BCS was based on a scale from 1-thin to 9-obese. The fixed effects of treatment, age and weight and samples were submitted to the Mixed Procedure of SAS[®] and means were compared by the orthogonal contrast. Vigor was higher in stallions older than four years and the index of morphological defects was lower in animals weighing more than 400 kg. In the fresh semen motility was greater in supplemented stallions. In frozen semen, motility, progressive motility, vigor and OTT were superior in the supplemented animals. In conclusion, the utilization of animals older than four years and weighing more than 400 kg and, moreover, the addition of omega-3 in the diet increases semen motility and vigor of fresh and frozen semen, maximizing its quality.

Keywords: Acid linolenic. Cryopreservation. Puberty. Semen motility.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 Influence of weight and age on the quality of Mangalarga Marchador stallion semen

Table 1	Quality parameters of fresh, cooled (2h, 6h, 12h e 24h) and frozen-thawed (24h) semen of Mangalarga Marchador stallions.....	50
Table 2	Age, body weight and seminal quality parameters of Mangalarga Marchador stallions	52

ARTIGO 2 Influence of omega-3 on the quality of Mangalarga Marchador stallion semen

Table 1	Quality parameters of equine frozen-thawed semen supplemented with omega-3 enriched oil	73
Table 2	CASA values for Mangalarga Marchador stallions supplemented or not with omega-3	75

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Fisiologia da reprodução de garanhões	12
2.2	Avaliação das características seminais	15
2.3	Resfriamento do sêmen	19
2.4	Congelamento do sêmen	21
2.5	Estresse oxidativo do sêmen	23
2.6	Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)	25
2.7	Efeito do ômega-3 na qualidade espermática de garanhões	27
2.8	Influência do escore de condição corporal (ECC), peso e idade na reprodução de garanhões	29
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	31
	REFERÊNCIAS	33
	SEGUNDA PARTE	41
	ARTIGO 1 Influence of weight and age on the quality of Mangalarga Marchador stallion semen	41
	ARTIGO 2 Influence of omega-3 on the quality of Mangalarga Marchador stallion semen	63

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Considerando o intenso crescimento da equinocultura no Brasil, estudos que seguem linhas de pesquisas relacionadas à nutrição, manejo e reprodução são de extrema importância para maximizar o desempenho atlético, melhorar a eficiência reprodutiva de éguas e garanhões e contribuir para o processo de melhoramento genético desta espécie.

Atualmente, com o intenso uso das biotecnologias da reprodução, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen congelado de garanhões visando aumento da qualidade do sêmen e, conseqüentemente, das taxas de prenhez nas éguas. Entretanto, devido à alta variabilidade individual que existe entre os garanhões quanto à resposta do sêmen ao processo de congelamento e resfriamento, o desenvolvimento de um protocolo único para a realização destes procedimentos se torna uma tarefa bastante difícil.

Uma das saídas é a determinação de características facilmente observadas que possam estar relacionadas com a qualidade espermática e, indiretamente, com a maturidade sexual, tais como peso corporal e idade do reprodutor. Definir em quais situações estas características sejam positivamente relacionadas à qualidade espermática pode fazer com que práticas de manejo específicas sejam estabelecidas antes da estação de monta, possibilitando que o sêmen coletado seja de melhor qualidade e mais resistente ao processo de resfriamento e congelamento.

Outra forma de melhorar a qualidade do sêmen é por meio da nutrição. O uso de ácidos graxos poli-insaturados, mais especificamente da série ômega-3, vem se tornando cada vez mais comum na reprodução equina. Isto é explicado

devido às funções que estes nutrientes exercem no organismo. As propriedades do ômega-3 permitem aumentar a fluidez da membrana dos espermatozoides, fazendo com que a membrana plasmática destas células se torne mais fluida e seja capaz de suportar melhor as modificações de volume e osmolaridade, além da ação destrutiva de substâncias oxidantes que são produzidas em grande quantidade durante o processo de resfriamento e, principalmente, congelamento.

O melhor entendimento da interação entre nutrição e reprodução de garanhões pode melhorar a eficiência reprodutiva desta espécie e acelerar o processo de melhoramento genético dentro das raças, fazendo com que a equinocultura se desenvolva e sejam aperfeiçoados cada vez mais às atividades em que os equinos são utilizados, como esporte, lazer e trabalho.

Os objetivos com estas pesquisas foram avaliar a relação entre idade, peso corporal, escore de condição corporal e o uso dietético de óleo rico em ácidos graxos ômega-3 sobre a qualidade espermática do sêmen fresco, resfriado e congelado de garanhões Mangalarga Marchador dentro da estação de monta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fisiologia da reprodução de garanhões

A fisiologia da reprodução de equinos está intimamente relacionada com a sazonalidade das estações do ano. Tanto garanhões quanto éguas sofrem influência da intensidade e quantidade de luz ao longo do dia, que se modifica ao longo das estações do ano (GINTHER et al., 2004; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Ao contrário de ovinos e caprinos, os garanhões não se tornam azospérmicos durante o período não reprodutivo. A concentração de testosterona e a libido diminuem, aumenta a incidência de defeitos morfológicos, diminui a

motilidade e o vigor espermático e a produção de espermatozoides decresce, mas nunca cessa completamente (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Em contrapartida, éguas apresentam atividade ovariana quase nula durante o período de inverno, o garanhão é capaz de continuar produzindo espermatozoides, embora em menores concentrações e de qualidade ligeiramente inferior ao longo do ano inteiro, quando estimulado (monta natural ou coleta de sêmen) (McKINNON; VOSS, 1993).

Dessa forma, o uso contínuo do garanhão ao longo do ano é uma prática de manejo comum em centrais de reprodução equina que aproveitam o período de inverno para coletar e congelar sêmen visando à próxima estação reprodutiva, até porque este é um período em que as éguas não estão apresentando atividade folicular ou estão prenhes.

Em estado selvagem a sazonalidade reprodutiva é de grande importância pois determina a época do ano em que os animais irão acasalar e, conseqüentemente, faz com que as crias nasçam em uma estação do ano com alta disponibilidade de alimento e água, favorecendo seu crescimento e aumentando suas chances de sobrevivência no período de escassez (GINTHER et al., 2004).

A melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal, é a principal responsável pelo efeito da sazonalidade em equinos. Este hormônio é sintetizado a partir do aminoácido triptofano por meio de duas enzimas principais: N-acetiltransferase (NAT) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) que são ativadas a partir da secreção de neurotransmissores liberados apenas durante a noite (NUNES, 1999), o que explica a maior concentração deste hormônio durante o inverno, período do ano em que a duração de luz diminui enquanto a duração de escuridão aumenta.

A melatonina regula a secreção da gonadotrofina (GnRH) que, por sua vez, controla a secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), relacionados à espermatogênese nos machos (McKINNON;

VOSS, 1993). Especificamente em equinos, a melatonina tem a capacidade de inibir a secreção de GnRH, diminuindo indiretamente as concentrações de FSH e LH, influenciando negativamente sobre a espermatogênese. Conforme a duração de luz ao longo do dia aumenta (primavera e verão) a produção de melatonina diminui e sua influência inibitória sobre a reprodução é removida (GINTHER et al., 2004).

Acredita-se que a melatonina seja capaz de inibir a liberação do GnRH devido à sua capacidade de diminuir a concentração intracelular de adenosinamonofosfato cíclico (AMPc) e também ao bloquear a mobilização e influxo de cálcio²⁺ nas células gonadotróficas da adeno-hipófise (PANG; LI; AYRE, 1998).

O responsável pelo primeiro estímulo hormonal no ciclo reprodutivo do garanhão é o hipotálamo, por meio da liberação pulsátil do GnRH. Este hormônio peptídico via sistema porta hipofisário atua na hipófise anterior, na qual é reconhecido pelas células presentes desencadeando a secreção dos hormônios gonadotróficos, LH e FSH, que por meio da corrente sanguínea atuam nas células dos testículos, resultando na produção de esteroides (estrógeno e testosterona), os quais participam da formação dos espermatozoides (PAPA; ALVARENGA; DELL AQUA JR, 2003).

O LH estimula a produção e a liberação da testosterona e do estrógeno pelas células de Leydig de garanhões adultos (EISENHAUER et al., 1994; EISENHAUER; ROSER, 1995). As altas concentrações locais de testosterona permitem que este hormônio atue na espermatogênese, com ação em vários órgãos alvos para manter as características físicas masculinas, a libido, e a função das glândulas sexuais acessórias (PICKETT; VOSS, 1998).

O FSH atua sobre as células de Sertoli e regula a produção de proteína ligadora de todos os componentes importantes para a produção de espermatozoides (função gametogênica). A liberação de FSH é regulada pela

ação da inibina e da ativina, que controlam a quantidade do fluido seminífero tubular, a manutenção da barreira hemato-testicular, e a sustentação do desenvolvimento das células germinativas essenciais para espermatogênese (SAMPER, 2009).

A alta concentração de estrógeno produzido nos testículos de garanhões supõe que o estrógeno, junto com a testosterona e o FSH desempenham importante papel na espermatogênese (ROSER, 2000). De acordo com ZIRKIN et al. (1994), a testosterona, sozinha, mantém a qualidade da espermatogênese, enquanto que o FSH controla a quantidade de espermatozoides produzidos, isso é observado em quase todos os mamíferos.

A secreção de testosterona é regulada por alças longas, curtas e ultracurtas. A alça longa envolve FSH, inibina e interações LH-testosterona. A alça curta envolve fatores de crescimento (IGF-I) e hormônios. A alça ultracurta regula as interações células de Sertoli/células germinativas/células mioídes (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O bom entendimento dos mecanismos de controle da função testicular do garanhão é de fundamental importância para a compreensão do processo reprodutivo dos mesmos bem como para o desenvolvimento de um manejo reprodutivo mais adequado à sua fisiologia, maximizando seu aproveitamento.

2.2 Avaliação das características seminais

Com o crescente uso da inseminação artificial no manejo diário das centrais de reprodução equina, a coleta de sêmen vem se tornando uma técnica cada vez mais rotineira e importante no melhoramento genético desta espécie, além de maximizar a utilização dos animais.

De modo a auxiliar na escolha dos melhores garanhões, inúmeros testes e análises podem ser realizados no sêmen coletado com o objetivo de avaliar sua qualidade e capacidade de fecundação.

De acordo com CBRA (1998), o sêmen equino apresenta volume médio de 60 mL, vigor espermático 3, ausência de movimento de massa, motilidade média de 70% e concentração de 9×10^9 espermatozoides por ejaculado. Entretanto, estas características apresentam grande variação entre as espécies e entre indivíduos dentro da mesma raça, o que torna as avaliações das características seminais de extrema importância para uma correta seleção de um garanhão como reprodutor (McKINNON; VOSS, 1993).

Uma das características mais comumente avaliada é a motilidade espermática, que expressa a proporção de espermatozoides móveis presentes no sêmen. Uma gota de sêmen é colocada entre uma lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C para avaliação em microscópio óptico em objetiva com aumento de 10x até 40x. Segundo CBRA (1998), garanhões com motilidade inferior a 70% no sêmen fresco e 30% no congelado, não devem ser utilizados para reprodução.

O vigor é avaliado em uma escala de zero a cinco (respectivamente ausência de vigor e vigor máximo) e representa a força com que os espermatozoides se movimentam (CBRA, 1998), normalmente é avaliado em conjunto com a motilidade.

A concentração espermática representa o número de células por mL de sêmen. Sua determinação é realizada por meio da contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer (FERNANDES; PIMENTEL, 2002). A avaliação da concentração é de grande importância durante o processo de congelamento de sêmen e inseminação artificial; quanto maior a concentração maior será o número de éguas inseminadas por ejaculado e maior será o número de palhetas que poderão ser congeladas por cada ejaculado (PAPA; DELL'ACQUA JÚNIOR,

2001). Recomenda-se a dose inseminante de 600 milhões de espermatozoides para inseminação com sêmen fresco e 1 bilhão de espermatozoides no caso de sêmen congelado (PAPA; DELL'ACQUA JÚNIOR, 2001).

A avaliação da integridade do acrossomo está relacionada com a capacidade de fertilização do espermatozoide, pois nessa região podem ser encontradas inúmeras enzimas que participam do processo de fertilização do oócito. Em geral, problemas na integridade do acrossomo estão relacionados com baixa ou sub fertilidade do garanhão (FERNANDES; PIMENTEL, 1997). Utiliza-se o método de coloração com POPE para diferenciação das células com acrossomo intacto (coradas) e danificado (não coradas) (POPE; ZHANG; DRESSES, 1991).

O teste de resistência osmótica permite avaliação da integridade da membrana do espermatozoide por meio de uma prova de resistência a diferentes períodos de incubação e ao choque osmótico. São adicionados 100 µL de sêmen *in natura* em 1,0 mL de solução 150 mOs/Kg de água (solução hiposmótica), a incubação é feita durante 40 minutos a 37°C (NIE; WENZEL, 2001). Após incubação os espermatozoides são avaliados em microscópio de contraste com aumento de 1000x para observação do aspecto do flagelo, quando este estiver enrolado é sinônimo de membrana íntegra, e quando o flagelo estiver estendido tem-se indicativo de ruptura da membrana e entrada de solução na célula (NIE; WENZEL, 2001).

A viabilidade espermática determina a proporção de células mortas e vivas no ejaculado, para isso, é feito um esfregaço com uma gota de sêmen e uma gota de corante eosina-nigrosina. No microscópio óptico com aumento de 400x as células serão classificadas como não coradas (espermatozoides vivos) e coradas (espermatozóides mortos) (MIES FILHO et al., 1982).

Quantificar os defeitos morfológicos dos espermatozoides é outra forma de estimar a qualidade do sêmen, pois quanto maior for a ocorrência de defeitos

menor é a chance que o espermatozoide possui de se aproximar e fertilizar o oócito (McKINNON; VOSS, 1993). Os defeitos de morfologia podem ser classificados como: anomalias na cauda, peça intermediária ou na cabeça do espermatozoide. Para avaliação da morfologia é utilizado microscópio de contraste de fase com aumento de 1000x após fixação prévia dos espermatozoides em solução de formol-citrato (CBRA, 1998).

Segundo Verstegen et al. (2002), inúmeros sistemas computadorizados foram desenvolvidos nos últimos anos para determinação de características espermáticas que dificilmente poderiam ser avaliadas por meio de microscopia comum, tais como velocidade, motilidade progressiva e linearidade. Dentre estes sistemas, o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) se tornou um dos mais utilizados para análise de sêmen das mais variadas espécies animais (mamíferos, aves, répteis e peixes).

O CASA avalia os espermatozoides individualmente, por meio da análise de inúmeras e sucessivas imagens que são tomadas a cada segundo (ARRUDA et al., 2011). Desta forma, é possível obter dados relacionados à velocidade, motilidade e trajetória que não seriam possíveis de ser obtidos por meio de microscopia comum. Algumas das informações que são disponibilizadas pelo CASA são: motilidade (MOT), motilidade progressiva (MOTP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência do batimento flagelar (BCF) e proporção de espermatozoides de velocidade rápida, média, lenta e estáticos (VERSTEGEN et al., 2002).

2.3 Resfriamento do sêmen

Após liberação do uso da inseminação artificial (IA) pela maior parte das associações de criadores, o transporte de sêmen resfriado aumentou consideravelmente nos últimos anos. Atualmente, o Brasil é o segundo país que mais utiliza o transporte de sêmen resfriado no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (PAPA et al., 2005).

Além disso, o sêmen de alguns garanhões não pode ser congelado, pois os espermatozoides são extremamente sensíveis ao processo de congelamento e não sobrevivem, sendo o uso de sêmen resfriado a maneira mais viável de maximizar o aproveitamento destes animais (VIDAMENT et al., 1997).

Quando os espermatozoides são mantidos a 5 °C ocorre redução do metabolismo celular, sua taxa metabólica decresce para 10% daquela observada em espermatozoides mantidos a 38 °C, e isto faz com que o sêmen possa ser preservado por longos períodos de tempo (AMANN; PICKETT, 1987; SQUIRES et al., 1999).

O resfriamento reduz a produção de CO₂ e ácido lático, substâncias tóxicas aos espermatozoides, e também diminui a peroxidação lipídica na membrana celular, aumentando o tempo de sobrevivência dos espermatozoides (BAUMGARTL et al., 1980).

Entretanto, o resfriamento feito de forma inadequada pode causar choque térmico aos espermatozoides, provocando lesões celulares em decorrência da alteração da propriedade física das membranas espermáticas (SQUIRES et al., 1999). A redução gradativa da temperatura e a adição de diluidores ao sêmen são formas de manter a viabilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides evitando o choque pelo frio (KELLER et al., 2001).

O uso de diluidores durante o processo de resfriamento diminui os danos causados pelo frio às células. Uma das características importantes dos diluidores é sua capacidade de estabilizar a membrana plasmática durante a fase de transição, momento em que ocorrem os danos celulares (DARENIUS, 1998). Esta fase de transição ocorre por volta dos 20,7 °C no sêmen equino, momento em que os lipídios da membrana passam de um estado fluido, no qual as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias dos ácidos graxos são rígidas e paralelas. A temperatura de transição é específica para cada tipo de ácido graxo presente na membrana celular (AMANN; GRAHAM, 1993).

Os efeitos causados pela fase de transição dos lipídios provocam respostas cinéticas não-lineares em algumas enzimas, incluindo algumas ATPases de membrana, cuja atividade depende do estágio físico dos lipídios (HOLT, 2000).

A taxa de prenhez de éguas inseminadas com sêmen fresco ou resfriado é bastante semelhante: 78,5% de prenhez para sêmen fresco (WEISS, 2003; XAVIER et al., 2010) e 75% para éguas inseminadas com sêmen resfriado (LOOMIS, 1992; LAGARES et al., 2000). Contudo, manter o sêmen resfriado por períodos superiores a 48 horas diminui a taxa de prenhez para cerca de 50% (PICKET, 1998).

Embora o resfriamento seja uma técnica de grande sucesso, a qualidade do sêmen resfriado pode variar consideravelmente em função das características individuais dos garanhões, o que dificulta a padronização desta técnica (PAPA et al., 2005).

2.4 Congelamento do sêmen

O congelamento de sêmen representa importante instrumento no melhoramento genético da espécie devido à maximização do uso de bons reprodutores. Entretanto, existe uma grande variação entre indivíduos na capacidade de sobrevivência do espermatozoide a este processo, após o descongelamento, as características seminais de muitos garanhões encontram-se muito aquém do ideal, fazendo com que a capacidade de fertilização do sêmen seja muito abaixo do satisfatório (GOMES et al., 2002).

Sendo assim, o desenvolvimento de um protocolo padrão de congelamento torna-se muito difícil. Isso exige uma adaptação de todo o processo de congelamento às características individuais de cada garanhão, dificultando o trabalho e o tornando mais oneroso (SQUIRES et al., 1999).

A fertilidade do sêmen congelado é relativamente menor quando comparada ao sêmen fresco e resfriado, observa-se uma diminuição de até 30% nos índices de prenhez das éguas (McKINNONN; VOSS, 1993). Provavelmente a menor taxa de prenhez se deve aos danos à estrutura e ao funcionamento da membrana plasmática decorrentes das drásticas variações de temperatura a que são submetidos os espermatozoides durante o processo de congelamento (PAPA et al., 2005; LOOMIS; GRAHAM, 2008).

O estresse osmótico induzido pelos crioprotetores, a formação de cristais de gelo intracelular e o desarranjo dos lipídeos na membrana plasmática, são alguns dos principais fatores que comprometem a viabilidade espermática (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Estas lesões celulares podem danificar o espermatozoide ao promover a ruptura de suas membranas (maneira direta) ou alterar as funções celulares por meio de modificações do processo metabólico (maneira indireta) (HOLT, 2000).

Os crioprotetores são utilizados com o objetivo de aumentar a sobrevivência das células protegendo-as contra os danos causados pelas baixas temperaturas, entretanto, os crioprotetores atuam como solvente e/ou soluto, induzindo alterações no volume celular capazes de romper a membrana plasmática (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). Além disso, os crioprotetores apresentam taxa de difusão pela membrana muito lenta em relação à água e, durante o descongelamento, o gradiente osmótico causado pela presença do crioprotetor induz ao aumento de volume celular (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; AMANN, 1999).

O estresse induzido pela formação dos cristais de gelo está associado às alterações na pressão osmótica da fração não congelada. A água é congelada e cristaliza como gelo fora da célula; a pressão osmótica do líquido remanescente do soluto aumenta, afetando o citoesqueleto celular e promovendo a ruptura da célula (WATSON, 1995; HOLT, 2000; WATSON, 2000).

A partir de 5 °C e conforme a temperatura vai diminuindo, ocorre aumento da permeabilidade da membrana ao Ca^{2+} , que contribui para alterações semelhantes às aquelas observadas na capacitação e na fusão entre a membrana celular e a membrana externa do acrossoma, inviabilizando o espermatozoide (WATSON, 1995). Além disso, quanto maior for a permeabilidade celular maior será a concentração intracelular de solutos e, conseqüentemente, haverá estímulo para entrada de água na célula que poderá provocar seu rompimento (HOLT, 2000).

A resposta dos espermatozoides ao congelamento é diferente entre as espécies de animais e também entre os indivíduos da mesma espécie e isto ocorre devido às variações encontradas no metabolismo e na bioquímica seminal (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Entretanto, o motivo pelo qual algumas espécies estão sujeitas ao choque térmico pelo frio enquanto outras não apresentam este

problema, está diretamente relacionado à composição lipídica da membrana celular espermática destas espécies.

A membrana plasmática dos espermatozoides equinos apresenta menor relação colesterol:fosfolipídeos. O colesterol aumenta a fluidez e a estabilidade da membrana, diminuindo a temperatura em que a membrana sofre a transição da fase fluída para a fase gel (KIRK; GRAHAM; SQUIRES, 2001).

O tipo de ácido graxo presente na constituição do fosfolipídio também interfere na fluidez da membrana, ácidos graxos poli-insaturados promovem uma modificação no ângulo formado entre os carbonos ligantes (108° nas ligações de ácidos graxos insaturados e 180° para saturados), e isto faz com que o fosfolipídio seja capaz de se adaptar às alterações no volume da célula durante o processo de congelamento e também de descongelamento (KIRK; GRAHAM; SQUIRES, 2001; LOOMIS; GRAHAM, 2008).

Este pode ser o motivo pelo qual o sêmen humano e de aves apresente resultados bastante positivos, devido ao alto teor de colesterol na membrana dos espermatozoides estas espécies não apresentam choque térmico pelo frio, oposto do que ocorre com equinos, ovinos, bovinos e suínos (LOOMIS; GRAHAM, 2008).

Como a proporção entre colesterol e fosfolipídio não pode ser alterada, por ser uma característica determinada geneticamente para cada espécie, pesquisas recentes vem estudando o efeito da adição de ácidos graxos poli-insaturados na dieta de modo a aumentar sua proporção nos fosfolipídios e melhorar a fluidez da membrana do espermatozoide.

2.5 Estresse oxidativo do sêmen

O processo de congelamento e descongelamento do sêmen estimula a síntese das espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS),

capazes de causar danos a todos os componentes celulares, como DNA, proteína, carboidrato e lipídeo (HALLIWELL, 1991). Entretanto, as ROS apresentam preferência pelas ligações carbono-hidrogênio do grupo metileno adjacente à ligação dupla, tornando os ácidos graxos poli-insaturados seus alvos principais (BALL; VO; BAUBER, 2001; AVANZI et al., 2011).

Por este motivo deve-se tomar cuidado com a inclusão excessiva de PUFAs na dieta, pois apesar de melhorar a fluidez da membrana celular diminuindo os efeitos deletérios das variações bruscas de temperatura, em excesso podem tornar a célula mais susceptível à ação das ROS.

A grande susceptibilidade dos espermatozoides às ROS está relacionada à pequena concentração de enzimas antioxidante presentes em seu conteúdo citoplasmático reduzido (BALL; VO, 2002). A maior parte destas enzimas, tais como glutadiona peroxidase, catalase e superóxido desmutase, encontram-se no plasma seminal que é removido durante o processo de congelamento a fim de aumentar a sobrevivência dos espermatozoides durante este processo, diminuindo significativamente a capacidade de resistência da célula espermática à ação das ROS (AVANZI et al., 2011).

O processo de descongelamento também causa danos oxidativos à célula devido ao rápido aumento na utilização de oxigênio pelos espermatozoides, após período de interrupção do metabolismo, determinando maior produção de radicais livres (BALL; VO; BAUBER, 2001; BALL; VO, 2002). Após iniciado, o processo de oxidação se torna autocatalítico, ou seja, ocorre intensificação gradativa devido à formação de hidroperóxidos e produtos secundários resultantes deste processo (DIX; AIKENS, 1993).

Na literatura existem evidências de que altas concentrações de ROS nas células espermáticas de garanhões causam inibição metabólica (WANG; SHARMA; SIKKA, 2003), desorganização da membrana celular (BALL; VO, 2002), diminuição da motilidade e vigor espermáticos (JONES; MANN;

SHERINS, 1979), diminui a capacidade de fertilização (PASQUALOTTO et al., 2000) e interfere negativamente no processo de capacitação celular (AGARWAL; SAID, 2005).

2.6 Ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs)

Os ácidos graxos poli-insaturados são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas encontrados em lipídios e óleos naturais que não podem ser sintetizados pelo organismo, por este motivo também são conhecidos como ácidos graxos essenciais. Os mamíferos não são capazes de sintetizar estas moléculas pelo fato de não possuírem enzimas do tipo dessaturases, responsáveis pela adição das insaturações entre os átomos de carbono (ANDRADE; CARMO, 2006).

Entre os PUFAs, alguns ácidos graxos possuem a primeira insaturação no terceiro átomo de carbono a partir do carbono metílico terminal, estes ácidos graxos são conhecidos como ômega-3 (ou n-3). Enquanto isso, outros apresentam a primeira insaturação no sexto átomo de carbono e, por isso, são conhecidos como ômega-6 (ou n-6).

Os principais representantes da família ômega-3 são: ácido α -linolênico (18:3), ácido eicosapentaenoico ou EPA (20:5) e ácido docosahexanoico ou DHA (22:6). Os alimentos que possuem alta concentração destas moléculas são: algas, fitoplâncton e animais marinhos de águas frias e profundas, tais como cavala, sardinha, salmão e truta (CONNOR, 2000). Os poucos vegetais ricos neste nutriente são linhaça, canola e colza (YOU DIM; MARTIN; JOSEPH, 2000).

O organismo dos equinos responde rapidamente à adição de EPA e DHA na dieta. King et al. (2008) observaram que no 3º dia após o início da suplementação ocorre um aumento significativo de sua concentração no sangue,

com um pico próximo ao 7º dia de suplementação, e a partir daí sua concentração se estabiliza. Contudo, no 9º dia após o término da suplementação ocorre uma queda superior a 75% nas concentrações sanguíneas de EPA e DHA.

Os principais representantes do ômega-6 estão: ácido linoleico (18:2) e ácido araquidônico (20:4) (ANDRADE; CARMO, 2006). Estes ácidos graxos são encontrados em grandes quantidades nos óleos vegetais provenientes da maioria das sementes e grãos de cereais, como óleo de milho, soja, girassol e castanhas (YOUUDIM; MARTIN; JOSEPH, 2000).

As funções biológicas dos PUFAs são inúmeras e, em sua maioria, não estão claramente definidas. As funções mais importantes parecem estar relacionadas à manutenção da integridade das células endoteliais, prevenção da aterosclerose e alterações cardiovasculares; estimulação da liberação de insulina; inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária; participação no desenvolvimento normal da placenta, crescimento fetal e desenvolvimento neuronal, participação nas funções imunomoduladoras, liberação de citocinas e síntese de eicosanoides (ANDRADE; CARMO, 2006; NRC, 2007; KING et al., 2008).

Os eicosanoides podem ser sintetizados a partir do EPA e do ácido araquidônico, ambos competindo pelas enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase. A primeira enzima está envolvida com a síntese de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, enquanto a segunda está relacionada com a síntese de leucotrienos (ANDRADE; CARMO, 2006).

Entretanto, eicosanoides oriundos do EPA atuam de maneira mais branda e menos potente no organismo, diminuindo a intensidade da resposta inflamatória celular (KING et al., 2008). As prostaglandinas oriundas do EPA fazem parte da série 1 (monoenoica) e 3 (trienoica), menos bioativas quando comparadas às prostaglandinas da série 2 (dienoica) proveniente do ácido araquidônico, por este motivo muitos trabalhos vem sendo realizados

hipotetizando que a suplementação com ômega-3 na dieta de éguas pode diminuir a resposta inflamatória após inseminação e/ou transferência de embrião, o que diminuiria as perdas embrionárias precoces comumente observadas na espécie equina (MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000; MATTOS et al., 2003).

O DHA, apesar de não atuar como substrato para produção dos eicosanoides, maximiza a utilização do ômega-3 ao diminuir a disponibilidade de ômega-6 por meio da inibição da liberação de ácido araquidônico da membrana celular (ANDRADE; CARMO, 2006).

Recentemente, Clarke (2001) demonstrou que os PUFAs não são utilizados somente como fonte energética e componente estrutural pelo organismo, mas também como importantes mediadores da expressão gênica. Grimm et al. (2002) já comprovaram que os ácidos graxos n-3 atuam como sinalizadores intracelulares, suprimindo a expressão gênica de genes envolvidos na lipogênese e induzindo a transcrição de genes envolvidos na oxidação lipídica e termogênese.

2.7 Efeito do ômega-3 na qualidade espermática de garanhões

As membranas celulares dos espermatozoides de garanhões, bem como da maioria das espécies domésticas, são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, entre eles o DHA e o EPA (BRINSKO et al., 2005). Considerando que a base da dieta dos equinos é constituída por milho e soja, pode-se dizer que a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados n-3 está abaixo do mínimo necessário: 0,5% de ácido linolênico com base na matéria seca (NRC, 2007). Sendo assim, é possível que a suplementação dietética de n-3 pode melhorar a qualidade espermática dos garanhões bem como sua capacidade de fertilização.

Os danos às células espermáticas causados pelo congelamento e resfriamento do sêmen estão relacionados, principalmente, à ruptura das membranas acrossomais, o que leva à perda de motilidade, viabilidade e diminuição da capacidade de fertilização do sêmen, fenômenos comumente relacionados ao choque térmico (WATSON, 2000). A capacidade que o sêmen apresenta de resistir ao choque térmico está diretamente relacionada à composição lipídica da membrana dos espermatozoides (BRINSKO et al., 2005).

Brinsko et al. (2005) observaram que a adição de um nutracêutico rico em DHA melhora a motilidade do sêmen resfriado e também sua tolerância à refrigeração. Elhordoy et al. (2008) concluíram que o DHA aumenta a produção diária de espermatozoides e melhora a qualidade do sêmen resfriado e congelado, possivelmente ao aumento no conteúdo de DHA na membrana plasmática dos espermatozoides. Entretanto, esta melhora foi maior em garantões de baixa qualidade seminal.

A adição de PUFAs na dieta aumenta a resistência das células espermáticas às variações bruscas de temperatura e osmolaridade que comumente ocorrem durante os processos de resfriamento e, principalmente, de congelamento do sêmen equino. Esta resistência está relacionada ao aumento da fluidez da membrana e, conseqüentemente, aumento na capacidade da célula em se adaptar às variações de volume que podem provocar sua ruptura (KIRK et al., 2001).

Entretanto, García et al. (2011) sugerem que o excesso de PUFA na dieta pode aumentar a suscetibilidade da membrana espermática a danos oxidativos, tornando as células mais vulneráveis ao ataque das espécies reativas de oxigênio (ROS).

Os lipídeos da membrana plasmática são os principais alvos das ROS e, como consequência imediata da desestabilização dos lipídeos da membrana,

tem-se aumento da permeabilidade da membrana seguida por perda de motilidade, diminuição da capacidade de fertilização e inabilidade de interação com a zona pelúcida do oócito (AITKEN; BAKER; SAWYER, 2003; RICKER et al., 2006).

Possivelmente, altas concentrações de n-3 na dieta, principalmente de EPA e DHA, pode ser a chave para melhorar a qualidade seminal do sêmen resfriado e congelado de garanhões (BRINSKO et al., 2005; ELHORDOY et al., 2008). Entretanto, a quantidade que deve ser oferecida ao animal deve ser cuidadosamente determinada a fim de evitar aumento no índice de peroxidação da membrana plasmática dos espermatozoides.

2.8 Influência do escore de condição corporal (ECC), peso e idade na reprodução de garanhões

A avaliação do ECC é um método prático e simples que não necessita de equipamentos e baseia-se em indicadores de gordura corporal que ajudam a estimar a quantidade de energia armazenada no corpo do animal (HENNEKE et al., 1983). O ECC é resultado do balanço energético, ou seja, da diferença entre o consumo e o gasto de energia. Diversos fatores podem afetar o ECC, tais como a intensidade e frequência de trabalho, problemas parasitários e dentários, disponibilidade de água e manejo nutricional.

Henneke et al. (1983) desenvolveram uma escala de ECC de 1 (animal excessivamente magro) a 9 (animal excessivamente obeso) baseada na observação da aparência e na palpação da cobertura de gordura em seis áreas do corpo do animal: bordo dorsal do pescoço, cernelha, costelas, parte posterior das espáduas, processos espinhosos lombares e área de inserção da cauda. O ECC 5 (moderado) é considerado o ECC ideal para a obtenção da máxima eficiência reprodutiva das éguas (NRC, 2007).

Poucas são as informações disponíveis na literatura sobre o grau de influência do ECC sobre o desempenho reprodutivo de garanhões. Harper e Tipton (2005) constataram que animais com ECC entre 7,5 e 8,5 apresentaram aumento no volume total do sêmen. Já nos estudos realizados por Warren (2005) não foram encontradas relações entre desempenho reprodutivo e ECC de garanhões, entretanto, este autor acredita que animais excessivamente magros ($ECC \leq 2$) ou obesos ($ECC \geq 8$) teriam problemas reprodutivos. No caso de animais com idade inferior a 5 anos com ECC superior a 7,0, existe uma redução da fertilidade e libido (HARPER; TIPTON, 2005).

A estimação do peso de equinos pode ser feita de três maneiras: por meio de fita de pesagem, fórmulas matemáticas (CARROLL; HUNTINGTON, 1988) e balança. A determinação do peso de um garanhão é de extrema importância para um correto balanceamento de sua dieta, principalmente durante a estação reprodutiva, em que ele é utilizado constantemente.

Animais com peso além do recomendado apresenta diminuição da libido (HARPER; TIPTON, 2005), dificuldade para realização da monta, dores articulares, risco de desenvolvimento de laminite e até mesmo problemas cardiovasculares relacionados à obesidade (WARREN, 2005). Da mesma forma, animais com peso abaixo do ideal pode não ter a energia necessária para cobrir as éguas, baixa libido e qualidade espermática reduzida (HARPER; TIPTON, 2005).

A idade exata em que um equino inicia a puberdade não é bem esclarecida, pode variar conforme a raça e o desenvolvimento inicial (MOREL; MINA, 1999). Segundo Gamboa et al. (2009) e Roser (2008) os garanhões atingem a puberdade por volta dos 21 meses de idade, entretanto este período pode variar entre os 14 e 25 meses de idade, conforme a raça, nutrição, genética, manejo e comportamento.

Alguns autores, como Morel e Mina (1999), preferem definir puberdade com base na concentração espermática e motilidade do sêmen, que segundo eles é cerca de 50×10^6 espermatozoides por ejaculado e motilidade acima de 10% em animais que acabaram de entrar na puberdade.

Garanhões com menos de três anos de idade já são capazes de fertilizar éguas, e apenas aos quatro anos a quantidade de espermatozoides produzidas é semelhante à um animal adulto. No entanto, a capacidade de suportar o trabalho exigido durante a época reprodutiva é inferior em relação a animais mais velhos, fazendo com que percam peso, aumentem o nível de estresse e diminuía a qualidade espermática (MOREL; MINA, 1999).

Para Gamboa et al. (2009), a maturidade sexual dos garanhões ocorre por volta dos seis anos de idade, quando o tamanho testicular é máximo assim como a produção diária de espermatozoides. A qualidade do sêmen começa a diminuir entre os 15 e 20 anos de idade, acompanhada pelo aumento de incidência de anomalias morfológicas e diminuição da motilidade (MOREL; MINA, 1999; SAMPER, 2001).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o objetivo de maximizar a qualidade do sêmen de garanhões, o peso e a idade dos animais devem ser levados em consideração. Animais com idade superior a quatro anos e peso acima de 400 kg apresentaram maior vigor espermático e menor incidência de defeitos morfológicos no sêmen fresco e resfriado. Já no sêmen congelado, foi observada maior taxa de motilidade no sêmen de animais mais velhos. Desta forma, o costume que muitos criadores tem de utilizar garanhões muito jovens e que ainda não alcançaram seu peso adulto final deve ser evitado, dando preferência a animais mais velhos e pesados.

A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 aumentou a motilidade total, motilidade progressiva, vigor e resistência osmótica da membrana celular no sêmen fresco e congelado. Não houve efeito da suplementação sobre o sêmen resfriado. A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de garanhões em reprodução é recomendada, principalmente no caso de animais cujo sêmen é congelado frequentemente.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, Londres, v. 95, n. 4, p. 503-507, mar. 2005.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; SAWYER, D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. **Reproductive BioMedicine Online**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 65–70, jul./aug. 2003.
- AMANN, R. P. Cryopreservation of sperm. **Encyclopedia of Reproduction**, v. 1, p. 773–783, 1999.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v.7, n. 3, p. 145-173, mai./jun. 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Lea and Febiger, p. 715-745, 1993.
- ANDRADE, P. M. M.; CARMO, M. G. T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. **MN–Metabólica**, Porto Alegre, v. 3, n. 8, p. 135-143, jul./set. 2006.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 145-151, abr./jun. 2011.
- AVANZI, B. R.; RAMOS, R. S.; NICHI, M.; FIORATTI, E. G.; DELL´AQUA JÚNIOR. J. A.; WECHSLER, F. S.; PAPA, F. O. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 18, n. 2, p. 226-238, mar. 2011.

BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 62, n. 4, p. 508-515, apr. 2001.

BALL, B. A.; VO, A. T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon lipophilic fluorescent de C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 23, n. 7, p. 259-269, oct. 2002.

BAUMGARTL, C.; BADER, H.; DROMMER, W.; LUNING, I. Ultrastructural alterations of stallion spermatozoa due to semen conservation. In: International Congress of Animal Reproduction, 9., 1980, Illinois. **Proceedings...** Illinois: Urbana, 1980. p. 134-137.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; MARK, B. C.; WILSON, E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, Woburn, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, mar. 2005.

CARROLL, C. L.; HUNTINGTON, P. J. Body condition scoring and weight estimation of horses. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 20, n. 1, p. 41-45, jan. 1988.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Transcription: A Molecular Mechanism to Improve the Metabolic Syndrome. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 4, p. 1129-32, apr. 2001.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. CBRA: Belo Horizonte, 1998. 49 p.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Maryland, v. 7, n. 2, p. 171-5, feb. 2000. Supplement.

DARENIOUS A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: STALLION REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1998, Montgomery. **Proceedings...**, Montgomery: Alabama, 1998. p. 60-70.

DIX, T. A.; AIKENS, J. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 6, n. 1, p. 2-18, jul. 1993.

EISENHAUER, K. M.; McCUE, P. M.; NAYDEN, D. K.; OSAWA, Y.; ROSER, J. F. Localization of aromatase in equine Leydig cells. **Domestic Animals Endocrinology**, Philadelphia, v. 11, n. 9, p. 291-98, sep. 1994.

EISENHAUER, K. M.; ROSER, J. F. Effects of lipoproteins, eLH, eFSH, and ePrL on equine testicular steroidogenesis in vitro. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 16, n. 3, p. 18-22, mar. 1995.

ELHORDOY, D. M.; CAZALES, N.; COSTA, G.; ESTÉVEZ, J. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p. 319-324, sep. 2008.

FERNANDES, C. E.; PIMENTEL, C. A. Anormalidades de acrossomo e fertilidade em um garanhão: relato de caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 345-349, abr./jun. 1997.

_____. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 829-834, jun. 2002.

GAMBOA, S.; FARIA, M. M.; SANTOS, J. R. Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia. Implications for stallion classification and assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 113, n. 1-4, p. 102-113, jul. 2009.

GARCÍA, B. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRÍGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, F. J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, Woburn, v. 75, n. 5, p. 811-818, mar. 2011.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Seasonal influence on equine dynamics. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 31-44, oct./dec. 2004.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative crioprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, Woburn, v. 58, n. 2-4, p. 277-279, aug. 2002.

GRIMM, H.; MAYER, K.; MAYSER, P.; EIGENBRODT, E. Regulatory potential of n3 fatty acids in immunological and inflammatory processes. **Brazilian Journal of Nutrition**, Campinas, v. 87, n. 10, p. 59-67, oct. 2002. Supplement 11.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 91, n. 3, p. 14-22, dec. 1991.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 11, n. 8, p. 73-88, jul. 1990.

HARPER, F.; TIPTON, E. Body condition score in horses. **Horse Express**, Tennessee, v. 24, n. 1, p. 1-4, apr. 2005.

HENNEKE, D. R.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L.; YEATS, B. F. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, Cambridge, v. 15, n. 4, p. 371-372, nov. 1983.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, aug. 2000.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal fatty acids peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, Los Angeles, v. 31, n. 6, p. 531-537, nov. 1979.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M. J.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 318-319, dec. 2001.

KING, S. S.; ABUGHAZALEH, A. A.; WEBEL, S. K.; JONES, K. L. Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 1114-1123, may 2008.

KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3-4, p. 317-318, dec. 2001.

LAGARES, M. A.; MEIRELES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozóide eqüino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, Niterói, v. 7, n. 3, p. 153-156, jun. 2000.

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. **American Association of Equine Practitioners**, Lexington, v. 38, n. 9, p. 629-647, sep. 1992.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, apr. 2008.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Polyunsaturated fatty acids and bovine Interferon- τ modify phorbol ester-induced secretion of PGF 2α and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v. 69, n. 3, p. 780-787, sep. 2003.

MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, Los Angeles, v. 5, n. 1, p. 38-45, jan. 2000.

McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 2. ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1993. 1137 p.

MIES FILHO, A.; DUTRA, J.; GIRÃO, R. N. Congelação do sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 5, n. 3-4, p. 27-57, jul./dez. 1982.

MOREL, D.; MINA, C. G. **Equine Artificial Insemination**. Oxfordshire: CAB International, 1999. 406 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requeriments of horses**. Washington: National Academy of Sciences, 2007. 341 p.

- NIE, G. J.; WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, Woburn, v. 55, n. 4, p. 1005-1018, mar. 2001.
- NUNES, M. T. **A glândula hipófise**. In: AIRES, M. M. *Fisiologia Animal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 782-811.
- PANG, S. F.; LI, L.; AYRE, E. A. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, New York, v. 14, n. 3-4, p. 157-166, jun. 1998.
- PAPA, F. O., DELL' AQUA JÚNIOR, J. A. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n.1, p. 458-46, jan./fev. 2001.
- PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL AQUA JR., J. A. **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. 2003, 29 p.
- PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL' AQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. L. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, n. 1, p. 19-27, jan. 2005.
- PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigations. **Fertility and Sterility**, Los Angeles, v. 73, n. 3, p. 459-464, mar. 2000.
- PICKETT, B. W., VOSS, J. L. Management of shuttle stallion for maximum reproductive efficiency – Part 1. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 18, n. 4, p. 214-24, apr. 1998.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSES, B. L. A. Simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Florida, v. 22, n. 1, p. 87-95, apr. 1991.
- RICKER, J. V.; LINFOR, J. J.; DELFINO, W. J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E. L.; TABLIN, F. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, Pittsburgh, v, 74, n. 2, p. 359-65, fev. 2006.

ROSER, J. F. **Reproductive endocrinology of the stallion**. In: SAMPER, J.C. (2. ed). Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: WB Saunders Company, 2000. p. 41-52.

_____. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 107, n. 3-4, p. 179-196, sep. 2008.

SAMPER, J. C. Management and fertility of mares bred with frozen semen- **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 68, n. 3-4, p. 219-228, dec. 2001.

_____. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2009. 336 p.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, p. 1-38, 1999 (Bulletin, 9).

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, Woburn, v. 57, n. 1, p. 149-179, jan. 2002.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, Woburn, v. 48, n. 6, p. 907-917, oct. 1997.

XAVIER, I. L. G. S.; SILVA FILHO, J. M.; CARVALHO, G. R. Efeitos do local de deposição do sêmen e do intervalo inseminação/ovulação sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 512-519, mar. 2010.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; SIKKA, S. C. Oxidative stress is associated with increases apoptosis leading to spermatozoa. **Fertility and Sterility**, Los Angeles, v. 80, n. 3, p. 531-535, sep. 2003.

WARREN, L. K. Feeding the stallion. Agri-Facts. **Agriculture, Food and Rural Development**, Newcastle, v. 50, n. 3, p. 1-4, sep. 2005.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 481-492, jul. 2000.

_____. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessments of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, Londres, v. 7, n. 5, p. 781-891, mai. 1995.

WEISS, R. R.; VIANNA, B. C.; MURADAS, P. R. Artificial insemination in mares with "in natura" and diluted semen. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 19-22, jan. 2003.

YOUDIM, K. A.; MARTIN, A.; JOSEPH, J. A. Essential Fatty Acids and the Brain: possible health implications. **International Journal of Developmental Neuroscience**, New York, v.18, n. 5, p. 383-99, may 2000.

ZIRKIN, B. R.; AWONIYI, C.; GRISWOLD, M. D.; RUSSEL, L. D.; SHARPE, R. Is the FSH required for adult spermatogenesis. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v. 15, n. 4, p. 273-76, apr. 1994.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1 – Influence of weight and age on the quality of
Mangalarga Marchador stallion semen**

P.G. Rodrigues^{1,3}; L.G.P. Rocha²; D.G. Neves¹; M.P. Bottino²; M.G.

Zangeronimo²; J.C. Souza¹

¹Animal Science Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

²Veterinary Medicine Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

³Corresponding author at: R.: Ararituaba, nº1025, Vila Maria, São Paulo/SP, CEP: 02122-011, Brazil. Phone: +55(35)95457-5836. E-mail address: paulagrodrigues@hotmail.com.

Article type: Applied Research.

Abstract

The objective was to evaluate the influence of weight and age on the quality of fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. Twenty stallions were used (3.5 to 15 years-old; 389 ± 39.7 kg). Semen was collected every 15 days for 60 days, for a total of five samples per animal

(n=100 observations). The following seminal characteristics were evaluated: motility, vigor, viability, morphology, osmotic tolerance test (OTT), and lipid peroxidation of the plasma membrane. Semen was evaluated upon sampling and at 2, 6, 12 and 24 hours after cooling and 24 hours after freezing. Body weight was estimated at heart girth by means of a commercial tape and the BCS was based on a scale from 1-thin to 9-obese. The fixed treatment, age, weigh, BCS and their interactions on the seminal characteristics were submitted to the Mixed Procedure of SAS[®] and means were compared by the Tukey test. There was a decrease in the quality of semen characteristics as time after cooling increased. Except for lower motility, all characteristics frozen semen were similar to those of 24 hour-cooled semen. Animals older than four years had greater vigor than younger stallions, considering both types of semen. The proportion of morphological defects was greater in animals weighing less than 400 kg. Frozen semen motility was greater in older animals ($33.20 \pm 2.71\%$) compared to younger animals ($26.30 \pm 0.17\%$), and there was greater incidence of morphological defects ($10.05 \pm 0.84\%$) compared to the heavier animals ($6.81 \pm 1.04\%$). The BCS did not influence any of the characteristics. It is recommended to use fresh or cooled semen and

preferably use stallions older than four years and weighing above or equal to 400 kg to maximize semen quality.

Keywords: equine reproduction, fertility, cryopreservation, semen motility.

Introduction

The use of cooled and frozen semen it is becoming very common among equine breeders seeking to improve their herds genetically, and the best way to transport this material is through cooling or freezing. Currently, Brazil ranks second among other countries in transport of cooled semen in the world, second to the United States only (Papa et al., 2005).

Keeping spermatozoa at temperatures below 5°C decreases the production of toxic substances such as CO₂ and lactic acid decreases lipid peroxidation of the cellular membrane and decreases the metabolic rate to 10% of that observed in cells kept at 38°C; all of these modifications

allow semen to be preserved for long periods outside the organism (Baumgartl et al., 1980; Squires et al., 1999).

However, the drastic variations in temperature to which spermatozoa are submitted to during the cooling process cause great harm to the structure and function of the plasma membrane. The osmotic stress induced by the cryoprotectants, the formation of intracellular ice crystals and the disarrangement of the plasma membrane lipids, are some of the factors that compromise sperm viability (Loomis and Graham, 2008).

The spermatozoa response to the freezing procedure is different among individuals of the same species and this occurs due to variations found in the metabolism and biochemistry of semen (Loomis and Graham, 2008). This makes it very difficult to develop a single freezing and cooling semen protocol.

Considering their practicality and easiness, the determination of optimum weight, age and body condition score that may reflect positively on the sperm quality of cooled and frozen semen is an attempt to minimize losses that occur during these procedures, increasing semen viability and improving pregnancy rates of mares.

The objective was to evaluate the influence of weight, body condition score and age on the quality of fresh, cooled and frozen semen of Mangalarga Marchador stallions.

Material and Methods

Animals and facilities

The experiment was conducted at the El Far stud (Lavras/MG, Brazil) and at Haras do Henrique stud (Carmo da Cachoeira/MG, Brazil) from October to December of 2011. Twenty stallions of the Mangalarga Marchador breed from 3.5 to 15 years-old and weighing 389.7 ± 39.7 kg.

Animals were kept on 4x4 stalls and the daily diet was 6 kg of tifton (*Cynodon spp*) hay and 4 kg of a pelleted concentrate (Equitage 12, Guabi Nutrição Animal, Campinas/SP, Brazil) offered twice a day, plus free access to a mineral mix and water.

The diet was based on the NRC (2007) requirements for breeding stallions.

Semen collection and processing

Three semen samples were obtained for three consecutive days before the actual experimental samples were taken to standardize the sperm reserve (McKinnon and Voss, 1993). Semen was collected at 15 days intervals during 60 days, for a total of five collections per stallion (n= 100 samples). During the experimental period the stallions were submitted to a semen collection routine of three times a week in order to ensure stable semen characteristics.

A Hannover model artificial vagina (AV) was used with a disposable plastic internal sheath and the semen was collected on a thermal cup. Water was heated at 45°C before placing it in the AV compartment. Mares in estrous were used for the collections. At collection the gel portion was filtered and the semen was diluted in the proportion of 1:1 (BotuSêmen[®], Botucatu/SP, Brazil) and stored in plastic bags (12 x 5 cm). The average concentrations were $101.9 \pm 71.3 \times 10^6$ and $100.3 \pm 59.5 \times 10^6$ spermatozoa /0.5 mL for the two experimental groups.

For cooling the semen was kept at 5°C in the plastic bags in a styrofoam box with ice and a thermometer.

For the freezing process semen was placed in 15 mL Falco tubes, centrifuged at 600g for 10 minutes for seminal plasma removal (Dell'Aqua Jr. et al., 2002) and a crioprotectant (BotuCrio[®], Botucatu/SP, Brazil) was added to the remaining pellets. Semen was transferred into 0.5 mL pallets and sealed with polyvinyl powder (Minitub, Porto Alegre/RS, Brazil) and submitted to the cooling curve: 20 minutes at 5°C, 20 minutes at 7 cm from the liquid nitrogen surface and plunged into liquid nitrogen (Avanzi et al., 2011). For thawing the pallets were maintained in water at 37°C for 30 seconds (García et al., 2011)

Evaluation of semen characteristics

The seminal characteristics analyzed were: concentration, motility and vigor (CBRA, 1998); acrosome integrity (Pope et al., 1991); osmotic tolerance test (Nie and Wenzel, 2001); viability (Mies Filho et al., 1982) and morphology (CBRA, 1998).

In order to determine semen susceptibility to lipid peroxidation the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) in a spectrophotometer with wave length of 532 nm (Ohkawa et al., 1979).

The evaluations were performed on the fresh samples at 30, 60, 120 minutes and 24 hours after cooling and 24 hours after freezing.

Weight and Body Condition Score (BCS)

Weight and BCS were evaluated on the same days of semen collection. Body weight was estimated by an equine tape (Ortovet[®], São Paulo/SP, BCS) and BCS was performed according to Henneke et al. (1983), considering the average of three previously trained evaluators.

Statistical analyses

For the statistical analyses two age classes were established (≤ 4.0 and > 4.0 years, respectively $n= 42$ observations and $n= 43$ observations), two BCS classes (≤ 5.0 and > 5.0 , respectively $n= 47$ and $n= 38$ observations) and two weight classes (< 400.0 and ≥ 400.0 kg, respectively $n= 52$ and $n= 33$ observations).

The fixed effects of treatment, sample, weight, BCS, age and their interactions on the seminal characteristics were submitted to the Mixed procedure of SAS[®] (SAS, 1998).

Means were compared by orthogonal contrast test at 5% significance level.

Results

All semen variables analyzed underwent losses ($P < 0.05$) as the time from placed into the cooling protocol increased. As for the frozen semen, vigor, OTT and morphology showed the same characteristics of the semen after cooling for 24 hours, whereas motility and viability were inferior (Table 1).

Table 1. Quality parameters* (numbers are % least square means \pm % SEM) of fresh, cooled (2h, 6h, 12h e 24h) and frozen-thawed (24h) semen of Mangalarga Marchador stallions.

Time	VIG (1-5)	MOT (%)	VIAB (%)	OTT** (%)	MORF (%)
Fresh	4.1 \pm 0.1 ^a	86.7 \pm 2.1 ^a	84.9 \pm 1.6 ^a	-	7.7 \pm 0.6 ^a
2h after cooling	3.7 \pm 0.1 ^b	75.7 \pm 2.1 ^b	76.9 \pm 1.6 ^b	37.1 \pm 1.0 ^a	8.5 \pm 0.6 ^{a,b}
6h after cooling	3.5 \pm 0.1 ^c	66.9 \pm 2.1 ^c	72.0 \pm 1.6 ^c	32.8 \pm 1.0 ^b	9.6 \pm 0.6 ^b
12h after cooling	3.3 \pm 0.1 ^d	57.7 \pm 2.1 ^d	65.9 \pm 1.6 ^d	29.5 \pm 1.0 ^c	9.7 \pm 0.6 ^b
24h after cooling	2.9 \pm 0.1 ^e	46.5 \pm 2.1 ^e	59.8 \pm 1.6 ^e	26.5 \pm 1.0 ^d	10.9 \pm 0.6 ^c
Frozen- thawed	2.8 \pm 0.4 ^e	32.5 \pm 1.4 ^f	41.4 \pm 1.4 ^f	26.7 \pm 1.1 ^d	9.5 \pm 0.5 ^{b,c}

Different letters in the same column indicate differences ($P < 0.05$). For each time category 100 ejaculates were evaluated.

*VIG – vigor; MOT – motility; VIAB – viability; OTT – osmotic tolerance test; MORF – morphology defects.

In fresh semen there was influence of age on semen vigor ($P=0.03$). Mean vigor was 3.38 ± 0.1 for stallions under four years-old and 3.68 ± 0.1 for those four years old and older. The proportion of morphological defects was greater for animals weighing less than 400.0 kg ($10.58 \pm 0.53\%$) compared to horses weighing 400.0 kg or more ($7.96 \pm 0.66\%$).

Similarly to fresh semen, vigor and the proportion of morphological defects of the cooled semen were influenced by stallion age ($P < 0.05$) and weight ($P < 0.05$). Vigor was greater in four years-old and older stallions compared to younger stallions. This difference was observed at 6 hours (3.41 ± 0.14 and 3.72 ± 0.15 , respectively for younger and older horses), at 12 hours (3.04 ± 0.12 and 3.38 ± 0.12), and 24 hours post cooling (2.75 ± 0.16 e 3.10 ± 0.17). Semen morphological defects were greater in lighter compared to heavier stallions. This difference was observed in lighter and heavier stallions, respectively at 2 hours ($9.38 \pm 0.55\%$ and $5.68 \pm 0.74\%$), at 6 hours ($10.25 \pm 0.74\%$ e $7.51 \pm 0.97\%$), at 12 hours ($11.08 \pm 0.88\%$ e $6.70 \pm 0.86\%$) and at 24 hours after cooling ($11.35 \pm 0.64\%$ e $6.70 \pm 0.86\%$).

For frozen-thawed semen, motility was greater ($P = 0.04$) in horses older than four years compared to younger horses. The proportion of morphological defects was greater ($P = 0.05$) in lighter horses compared to the heavier class. None of the remaining seminal quality characteristics studied was affected by stallion age or weight (Table 2)

Table 2. Age and body weight and frozen-thawed seminal quality parameters (numbers are % least square means \pm % SEM) of Mangalarga Marchador stallions.

	Age		Body Weight	
	\leq 4.0 years	> 4.0 years	< 400 kg	\geq 400 kg
Motility (%)	26.30 \pm 0.17 ^a	33.20 \pm 2.71 ^b	29.51 \pm 2.30	29.90 \pm 3.10
Vigor (1-5)	2.56 \pm 0.17	2.89 \pm 0.17	2.81 \pm 0.14	2.62 \pm 0.19
Viability (%)	39.35 \pm 3.87	42.30 \pm 3.83	44.50 \pm 3.21	37.14 \pm 4.07
OTT* (%)	26.45 \pm 1.92	27.02 \pm 1.92	27.74 \pm 1.63	25.73 \pm 2.18
Morphologic defects (%)	8.34 \pm 1.03	8.52 \pm 1.01	10.05 \pm 0.84 ^a	6.81 \pm 1.04 ^b
Acrosome integrity (%)	43.18 \pm 3.10	43.53 \pm 3.09	41.29 \pm 2.61	45.43 \pm 3.41
TBARs (ng/10⁶ spermatozoa)	19.56 \pm 4.15	20.11 \pm 4.17	22.48 \pm 3.55	17.18 \pm 4.79

Distinct letter in the rows indicate statistical differences ($P < 0.05$). For each parameter 100 ejaculates were analyzed.

*OTT – osmotic tolerance test.

None of the remaining semen characteristics were influenced ($P > 0.05$) by BCS for fresh, cooled and frozen-thawed semen.

Discussion

The decrease on semen quality observed during cooling and freezing, compared to fresh semen, may be related to damage caused by

heat shock, osmotic stress and oxidative damage to the cell membrane of spermatozoa (Mazur, 1984).

According to Amann (1999), the decrease on motility is related to changes on the cellular permeability induced by the low temperature. As the semen is continuously exposed to lower temperatures, vigor and motility decrease, as well as, increased acrosome damage and loss of intracellular components, which could damage the cell irreversibly (McKinnon and Voss, 1993; Pickett, 1995). This would explain the gradual decrease in motility and vigor throughout the cooling periods and as consequence of freezing observed in the present study. The motility drop in cooled semen at 24 hours was 46.4 % and of 29.8% for vigor, compared to fresh semen, and on the frozen-thawed semen the respective motility and vigor drops were 62.5 and 31.7%.

Cell osmotic tolerance and cell membrane viability were negatively affected by the cooling time and by the freezing process. According to Holt (2000), in temperatures below 5°C, structural modifications occur on the lipid membrane, which goes from a fluid to a gel phase. This modifications decrease the cellular capacity to tolerate the osmotic stress caused by the addition of diluents and, especially, from the

cryoprotectants, which alters the osmotic balance between the solute and the solvent from the intra and extracellular compartments (Watson, 2000; Glazar et al., 2009).

Considering the damages caused on the structural properties of the cell membrane due to the lipid rearrangement, the chances of cell rupture are dramatically increased, thus reflecting negatively on the quality of the semen. When the sperm membrane is intact, the cell is able to tolerate volume shifts caused by changes on the osmotic gradient without rupturing (Holt, 2000; Glazar et al., 2009).

The increase on the proportion of morphologic defects observed throughout the cooling periods and after thawing may be related to sperm structural damage. Isolated and broken tails and heads correspond to the majority of defects related to the cooling and or frozen processes, added of manipulation damage such as centrifugation and pipetting can all account for the reported results.

Individual variations within and between breeds are important characteristics which may impact on expressive losses in quality and low semen tolerance to cooling and freezing processes. Alvarenga et al. (1996) concluded that stallions of the Mangalarga Marchador and

Mangarlaga Paulista breeds, which share common ancestry, showed the lowest freezing indexes compared to exotic breeds such as, Hannoverian, Holsteiner, Tracknner e Quarter Horse, which have average motility higher than 50% after freezing. These authors believe that the main concern of Mangalarga Marchador stallions is their low tolerance to osmotic stress.

Downsett and Knott (1996), evaluated 170 stallions of nine different breeds, concluded that the only characteristics that did not vary between breeds were pH and color, all other variables analyzed, such as motility, morphology, viability and proportion of dead spermatozoa, differed among breeds. Thus, more studies with the Mangalarga Marchador breed specifically, to increase the knowledge about the reproductive physiology and to develop cooling and freezing techniques considering its inherent breed physiological characteristics, in order to maximize its reproductive efficiency.

None of the semen quality parameters were influenced by BCS, either for fresh or in cooled or frozen-thawed semen. Likewise, Warren (2004) did not detect influence of BCS on fertility and seminal characteristics of stallion semen, even then, this author believes that

extreme BCS values (below 2 and above 8 in the Henneke et al., 1983 scale) may decrease semen quality.

Lewis (2000) and Frape (2008) suggested that stallions with BCS above seven showed decreased libido, fertility and breeding problems.

The lowest BCS value observed in this study was four and the highest was six, which characterizes a variation index perhaps too small for any significant effect on semen quality to be detected.

Independently of whether the semen was fresh, cooled or frozen-thawed, weight and age classes influenced some of the quality parameters analyzed. The proportion of morphological defects was greater for the lighter weight class whereas vigor and motility were related to the age class such that younger stallions had poorer frozen semen quality. Obviously, since the age range was quite extensive in this experiment (3.5 to 15 years-old) these effects may be confounded with sexual maturity.

According to Gamboa et al. (2009) and Roser (2008), puberty in stallions may be attained between 14 and 24 months of age, which also indicates a relatively wide range. In this scenario, and considering our findings, Mangalarga Marchador stallions may reach puberty at a later age. Moreover, it must be considered that sexual maturity is influenced by

a range of factors, which includes nutrition, genetics and stress, according to Morel and Mina, (1999) and testosterone levels, as well (Roser, 2008). These authors observed that only after six years of age stallions are fully reproductively competent. On the other extreme, which was untested in the present experiment, stallions lose fertility at much advanced ages, such as above 20 years-old according to one study (McKinnon and Voss, 1993) and outside our range of observations.

Similarly to the results in the present experiment, Melo et al. (1998) reported a greater proportion of primary spermatocytes and spermatids in animals younger than four years compared to older stallions. The observations by McKimmon and Voss (1993) that in younger stallions spermatogenesis has not reached its full capacity and an increased proportion of defective sperm is still present compared to older horses corroborate our findings.

In general, the results observed in the present experiment are extremely relevant for future studies on the fertility of Mangalarga Marchador stallions, since morphology is directly related to motility and vigor which impact mare pregnancy rates, according to Love (2011).

Conclusions

Semen must be kept for the shortest time possible under cooling to avoid quality losses. In order to maximize semen quality, in conditions similar to the ones related in this experiment, it is recommended the use of stallions older than four years old and weighing at least 400 kg during the breeding season. These recommendations are more relevant if one intends to use frozen-thawed semen on a routine basis.

Acknowledgments

To the Universidade Federal de Lavras (UFLA) and to the Departaments of Animal Science and Veterinary Medicine at UFLA for their support in the execution of this project. To CAPES for the doctorate scholarship. To the El Far stud and Haras do Henrique stud for all their immense support and for graciously providing the stallions of the study. To Professor Márcio Zangerônimo and Luiz Gustavo Pessoa Rocha for the inestimable laboratorial and technical support. To Professor

Flamarion Tenório de Albuquerque and his team for the valuable support in the semen sampling process.

References

Amann RP. 1999. Cryopreservation of sperm. *Encyclopedia of Reproduction*, 1:773–783.

Alvarenga MA, Papa FO, Buratini Junior J. 1996. The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. *In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. Proceedings...* Amesterfoort, 1996. p. 82.

Avanzi BR, Ramos RS, Nichi M, Fioratti EG, Dell’Aqua Júnior JA, Wechsler FS, Papa FO. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 2, p. 226-238, 2011.

Baumgartl C, Baber H, Drommer W, Luning I. 1980. Ultrastructural alterations of stallion spermatozoa due to semen conservation. *In: International Congress of Animal Reproduction, 9., 1980, Illinois. Proceedings...* Illinois: Urbana, p. 134-137.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.* 1998. 2. ed. CBRA: Belo Horizonte, 49 p.

Dell’Aqua Júnior A, Papa FO, Zahn FS, Alvarenga MA, Leonardo H. 2002. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26(3):189-91.

Frape D. 2008. *Nutrição and alimentação de equinos.* 3. ed. São Paulo: Rocca, 602 p.

Dowsett KF, Knott, LM. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology*, 46:397-412.

Gamboa S, Faria MM, Santos JR. 2009. Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia. Implications for stallion classification and assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 113:102-113.

García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Rodríguez AM, Bolaños JMG, Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 75:811–818.

Glazar AI, Mutton SF, Liu J, Benson JD, Crister JK, Squires EL, Graham JK. 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, 59: 201-206.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, 11:73–88.

Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeats BF. 1983. Relationship between body condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4):371-372.

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62:3-22.

King SS, AbuGhazaleh AA, Webel SK, Jones KL. 2008. Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. *Journal of Animal Science*, 86:1114-1123.

Lewis LD. 2000. *Nutrição Clínica Equina*. São Paulo: Roca. 710 p.

Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105:119-128.

Love CC. 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76: 547–557.

Mazur P. 1984. Freezing of living cell: mechanisms and implicants. *Animal Journal of Physiology*, 247:125-142.

McKinnon AO, Voss JL. 1993. *Equine reproduction*. 2. ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1137 p.

Melo MIV, Sereno RB, Henry M, Cassali GD. 1998. Peripuberal sexual development of Pantaneiro stallions. *Theriogenology*, 50:727-737.

Mies Filho A, Dutra J, Girão RN. 1982. Congelamento do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 5:27- 57.

Morel D, Mina CG. 1999. *Equine Artificial Insemination*. Cabi Publishing. Oxfordshire: CAB International, 406 p.

National Research Council. 2007. *Nutrients requeriments of horses*. Washington: National Academy of Sciences, 341 p.

Nie GJ, Wenzel JGW. 2001. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55:1005-1018.

Papa FO, Melo CM, Dell'Aqua Júnior A, Macedo LP, Carvalho AG, Alvarenga MA, Medeiros ASL. 2005. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33:19-27.

Pickett BW, Voss JL. 1998. Management of shuttle stallion for maximum reproductive efficiency – Part 1. *Journal of Equine Veterinary Science*, 18:214-24.

Pope CE, Zhang YZ, Dresses BLA. 1991. Simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22(1):87-95.

Roser JF. 2008. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science*, 107:179–196.

Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE. 1999. *Cooled and frozen stallion semen*. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, p. 1-38.

Statistical Analysis Systems – SAS. 1998. *User's guide: version 6*. Cary, NC, 1686 p.

Warren LK. 2004. Body condition scoring your horse. *Agriculture, Food and Rural Development*, 20(1):1-3.

Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60:481-492.

ARTIGO 2 – Influence of omega-3 on the quality of Mangalarga**Marchador stallion semen**

P.G. Rodrigues^{1,4}; L.G.P. Rocha²; M.P. Bottino²; M.Nichi³; A.G.

Bertechini¹; J.C. Souza¹

¹Animal Science Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

²Veterinary Medicine Department, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

³Animal Reproduction Department, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, São Paulo, Brasil.

⁴Corresponding author at: R.: Ararituaba, nº1025, Vila Maria, São Paulo/SP, CEP: 02122-011, Brazil. Phone: +55(35)95457-5836. E-mail address: paulagrodrigues@hotmail.com.

Article type: Applied Research.

Abstract

The use of reproductive technology increases the relevance of cooling and freezing semen for transport and preservation purposes. The objective was to evaluate the influence of omega-3 supplementation on the quality of fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. Ten stallions were used (3.5 to 15 years-old; 389 ± 39.7 kg) allocated

randomly to the following treatments: 150 mL of omega-3 enriched oil (n=10) and no supplementation (n=10). Stallions were switched over in the treatments after a 15 day interval. Semen was collected every fifteen days during 60 days, for a total of five samples per animal (n=100 samples). The following seminal characteristics were evaluated: motility, vigor, viability, morphology, osmotic tolerance test (OTT), and lipid peroxidation of the plasma membrane. Semen was evaluated upon sampling and at 2, 6, 12 and 24 hours after cooling and 24 hours after freezing. Computer assisted analysis (CASA) was used to evaluate frozen semen. The fixed effects of treatment and sample were submitted to the Mixed Procedure and means were compared by the orthogonal contrast test. There was no effect of treatments on the quality of cooled semen. Frozen semen motility, vigor and OTT were superior in supplemented animals. Similar results were observed under CASA analyses (motility of $22.52 \pm 1.61\%$ and $13.82 \pm 1.62\%$; progressive motility of $6.73 \pm 0.85\%$ and $2.89 \pm 0.86\%$, for supplemented and non-supplemented animals, respectively). It is recommend the addition of omega-3 in breeding stallion diets, especially it freezing should be attempted.

Keywords: computer assisted semen analysis, equine reproduction, fertility, polyunsaturated fatty acids, semen motility.

Introduction

The use of cooled and frozen semen has become very common among equine breeders seeking to improve their herds genetically, and the best way to transport this material is through cooling or freezing (Papa et al., 2005).

According to Loomis and Graham (2008), the spermatozoa response to sudden temperature changes is different among animal species and also among individuals of the same species. This occurs due to specific differences on semen metabolism between individuals, which makes the development of cooling and freezing protocol an expensive and complex process (Squires et al., 1999; Gomes et al., 2002).

The reason why some species are more susceptible to the thermal shock by low temperatures than others is directly related to the lipid composition of the cellular membrane (Avanzi et al., 2011). In equines, the sperm plasma membrane is characterized by a lower proportion of

cholesterol in relation to phospholipids (Loomis and Graham, 2008). Cholesterol is responsible to increase the fluidity and stability of the cell membrane, decreasing the temperature in which it transitions from the fluid to the gelatinous phase (Holt, 2000; Kirk et al., 2001).

Since the proportion between cholesterol and phospholipid cannot be altered, because it is a characteristic determined genetically for each species and individual, recent research has been focusing of the effect of the addition of polyunsaturated fat to the diet causing an increase on its proportion in relation to the sperm membrane phospholipids improving its fluidity.

The objective was to determine the effect of the dietary supplementation of polyunsaturated fatty acids omega-3 in the quality of fresh, cooled and frozen Mangalarga Marchador stallion semen.

Material and Methods

Animals and facilities

The experiment was conducted at the El Far Stud (Lavras/MG, Brazil) and at Haras do Henrique stud (Carmo da Cachoeira/MG, Brazil) from October to December of 2011. Ten stallions of the Mangalarga Marchador breed from 3.5 to 15 years-old and weighing 389.7 ± 39.7 kg.

Animals were kept on 4x4 stalls and the daily diet was 6 kg of tifton (*Cynodon spp*) hay and 4 kg of a pelleted concentrate (Equitage 12, Guabi Nutrição Animal, Campinas/SP, Brazil) offered twice a day, plus free access to a mineral mix and water.

The diet was calculated based on the NRC (2007) requirements for breeding stallions.

Treatments

Diets were calculated based on NRC (2007) requirements for breeding stallions. The following treatments were applied:

- Treatment A (n= 10) = 150 mL of PUFA omega-3 oil daily (Comércio e Indústria Uniquímica Ltda., São Paulo/SP, Brazil) added to the concentrate;
- Treatment B (n= 10) = no supplementation;

The treatments were imposed during two replicates. In the first, half of the stallions (n=5) were assigned to the omega-3 diet and the other half (n=5) to no supplementation. In the second replicate, stallions were reversed into the treatments after a 15 days interval from the end of the 60 day treatment period in order to remove the effect of the oil from the body of those stallions being supplemented previously and for the ones not previously supplemented to adapt to the oil (King et al. 2008).

The lipid composition of the oil was analyzed chromatography: 22.0% of oleic acid (18:1); 19.0% of linoleic acid (18:2); 55.0% of linolenic acid (18:3), 2.1% of eicosapentenoic acid (20:5, EPA) e 1.9% of docosahexaeoic acid (22:6, DHA). The anti-nutritional factors were deactivated and enriched with vitamin E

Before the initiation of the experiment, stallions went through an adaptation period of 14 days in which the oil was gradually offered until the total amount proposed. Daily increments of 50 mL were firstly offered

in the first seven days, divided into two equal portions given in the morning and in the afternoon. The seven subsequent days were necessary so that the EPA and DHA blood concentrations reached its maximum (King et al., 2008).

Semen collection and processing

Three semen samples were obtained for three consecutive days before the actual experimental samples were taken to standardize the sperm reserve (McKinnon and Voss, 1993). Semen samples were collected at 15 days intervals throughout 60 days, for a total of five collections per stallion (n= 100 collections). During the experimental period the stallions were submitted to a semen collection routine of three times a week in order to ensure stable semen characteristics.

A Hannover model artificial vagina (AV) was used with a disposable plastic internal sheath and the semen was collected on a thermal cup. Water was heated at 45°C before placing it in the AV compartment. Mares in estrous were used for the collections. At collection the gel portion was filtered and the semen was diluted in the

proportion of 1:1 (BotuSêmen[®], Botucatu/SP, Brazil) and stored in plastic bags (12 x 5 cm). The average concentrations were $101.9 \pm 71.3 \times 10^6$ and $100.3 \pm 59.5 \times 10^6$ spermatozoa /0.5 mL for the two experimental groups.

For cooling the semen was kept at 5°C in the plastic bags in a styrofoam box with ice and a thermometer.

For the freezing process semen was placed in 15 mL Falco tubes, centrifuged at 600g for 10 minutes for seminal plasma removal (Dell'Aqua Jr. et al., 2002) and a crioprotectant (BotuCrio[®], Botucatu/SP, Brazil) was added to the remaining pellets. Semen was transferred into 0.5 mL pallets and sealed with polyvinyl powder (Minitub, Porto Alegre/RS, Brazil) and submitted to the cooling curve: 20 minutes at 5°C, 20 minutes at 7 cm from the liquid nitrogen surface and plunged into liquid nitrogen (Avanzi et al., 2011). For thawing the pallets were maintained in water at 37°C for 30 seconds (García et al., 2011)

Evaluation of semen characteristics

The seminal characteristics analyzed were: concentration, motility and vigor (CBRA, 1998); acrosome integrity (Pope et al., 1991);

osmotic tolerance test (Nie and Wenzel, 2001); viability (Mies Filho et al., 1982) and morphology (CBRA, 1998).

In order to determine semen susceptibility to lipid peroxidation the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) in a spectrophotometer with wave length of 532 nm (Ohkawa et al., 1979).

The evaluations were performed on the fresh samples at 30, 60, 120 minutes and 24 hours after cooling and 24 hours after freezing.

CASA semen analyses of frozen-thawed semen

After thawing, a semen drop was placed on a preheated slide at 37°C and covered with a cover slide so that sperm dynamic characteristics could be analyzed on a computer assisted system (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA). The following analyses were performed: motility (MOT), progressive motility (PGM), track speed (VCL), path velocity (VAP), progressive velocity (VSL), straightness (STR), linearity (LIN), lateral amplitude (ALH) and beat frequency (BCF).

Statistical analyses

The experimental design was a cross over, in which the animals were switched in the treatments.

The fixed effects of treatment, fresh, cooling and freezing semen and their interactions on the seminal characteristics were submitted to the Mixed procedure of SAS[®] (SAS, 1998).

Means were compared by orthogonal contrast at 5% significance level.

Results

Fresh semen motility was greater ($P=0.07$) for omega-3 supplemented stallions ($89.66 \pm 1.71\%$) when compared to no supplemented stallions ($85.53 \pm 1.79\%$). Viability, proportion of morphological defects and vigor were similar between treatments ($P>0.05$).

None of the semen quality parameters at 2, 6, 12 and 24 hours of cooling were influenced by omega-3 supplementation ($P>0.05$).

Motility of frozen-thawed semen was greater for ($P=0.009$) omega-3 supplemented animals. Vigor and OTT were also greater ($P=0.04$ e $P=0.01$, respectively for vigor and OTT, respectively), for omega-3 supplemented stallions (Table 1).

Table 1. Quality parameters (numbers are % least square means \pm % SEM) of equine frozen-thawed semen supplemented with polyunsaturated fatty acids omega-3 enriched oil.

	omega-3 supplementation	No supplementation	Probability P=
Motility (%)	34.40 \pm 2.52 ^a	24.59 \pm 2.87 ^b	0.009
Vigor (1 - 5)	2.77 \pm 0.17 ^a	2.36 \pm 0.17 ^b	0.04
Viability (%)	44.75 \pm 3.69	36.89 \pm 3.98	0.13
OTT* (%)	30.02 \pm 1.79 ^a	23.45 \pm 2.03 ^b	0.01
Morphologic defects (%)	8.27 \pm 0.97	9.23 \pm 1.04	0.47
Acrosome integrity (%)	46.22 \pm 2.93	40.50 \pm 3.24	0.15
TBARs (ng/10⁶ spermatozoa)	22.45 \pm 3.87	17.21 \pm 4.42	0.29

Different letters within the rows indicate statistical differences. 100 samples were evaluated for each variable studied.

* OTT – osmotic tolerance test.

Although no difference was observed on the TBARs (ng/10⁶ spermatozoa) concentration between treatments (main effect), but the TBARs

concentration was higher ($P=0.004$) at 60 days after the initiation of treatment (main effect of period or sample day) compared to the other periods considered together. There was no difference between the samples taken at 30 days (13.17 ± 5.45 TBARs ng/ 10^6 spermatozoa), 15 days (14.22 ± 4.97 TBARs ng/ 10^6 spermatozoa), 30 days (13.01 ± 5.54 TBARs ng/ 10^6 spermatozoa) e 45 days (16.95 ± 5.68 TBARs ng/ 10^6 spermatozoa) of the experiment, however, on the 60th day of the experiment the concentration of oxidative substances was increase (41.81 ± 5.74 TBARs ng/ 10^6 spermatozoa).

Frozen-thawed semen motility and progressive motility evaluated in the CASA system was greater for stallions supplemented with polyunsaturated fatty acids omega-3 enriched oil (Table 2).

Table 2. CASA* values (numbers are % least square means \pm % SEM) for Mangalarga Marchador stallions supplemented or not with omega-3.

	omega-3 supplementation	No supplementation	Probability P=
MOT (%)	22.52 \pm 1.61 ^a	13.82 \pm 1.62 ^b	0.001
PGM (%)	6.73 \pm 0.85 ^a	2.89 \pm 0.86 ^b	0.006
VAP ($\mu\text{m/s}$)	60.83 \pm 4.34	52.26 \pm 4.38	0.18
VSL ($\mu\text{m/s}$)	48.11 \pm 2.95	42.78 \pm 2.99	0.22
VCL ($\mu\text{m/s}$)	123.65 \pm 8.13	102.4 \pm 8.23	0.08
ALH (μm)	5.94 \pm 0.60	4.85 \pm 0.61	0.22
BCF (Hz)	35.12 \pm 4.26	27.47 \pm 4.29	0.22
STR (%)	64.07 \pm 7.24	54.22 \pm 7.30	0.35
LIN (%)	36.33 \pm 3.04	31.62 \pm 3.07	0.29

Different letters within the rows indicate statistical differences. 100 samples were evaluated for each variable studied.

* MOT – motility; PGM – progressive motility; VCL – track speed; VAP – path velocity; VSL – progressive velocity; STR – straightness; LIN – linearity; ALH – lateral amplitude; BCF – beat frequency.

Discussion

Semen motility, vigor and osmotic resistance responded positively to the addition of omega-3 on the diet of breeding stallions, for either fresh or frozen-thawed semen.

The semen quality parameters evaluated did not differ between treatments. Similarly, Brinsko et al. (2005), after adding DHA to the diet of stallions, did not find an effect of DHA supplementation on semen quality. Those authors evaluated the semen at 24 hours post cooling, however, at 48 hours they detected significant raises on semen motility rate and progressive motility. They concluded that DHA may have the capacity to prolong the plasma membrane resistance to osmotic variation.

Grady et al. (2009) evaluated the effect of two different sources of omega-3 in stallion diet. They compared fish and linseed oils, and concluded that the source does not interfere with the positive results on semen quality of stallions by omega-3 supplementation. According to those authors, the most important factor that enables to bring about benefits on semen quality is its concentration on the diet.

According to Holt (2000), starting at temperatures immediately below 5°C, conformation modifications of the lipid component of the cell membrane occur, when it progresses from a fluid to a gel phase. These conformational changes decrease the capacity of the cell in tolerating the osmotic stress elicited by addition of diluents and, especially, of cryoprotectants, which alters the osmotic balance between solute and

solvent present in the extra and intracellular compartments (Watson, 2000; Glazar et al., 2009).

Considering the damage to the structural properties of the membrane and its lipid rearrangement, the chances of cellular rupture are increased, reflecting negatively on semen quality. When the spermatozoa cell membrane is intact, the cell is capable of tolerating volume shifts that occur as a result of changes on the osmotic gradient without undergoing rupture (Holt, 2000; Glazar et al., 2009).

Both, omega-6 and omega-3 are classified as PUFAs, however, animals submitted to diets containing high proportions of omega-6 and low omega-3 were associated to lower fertility indexes. Literature corroborates this concept in numerous animal species, such as swine, rats and even humans (Conquer et al., 1999; Conquer et al.; 2000; Maldjian et al., 2003; Tavailani et al., 2008).

Tavailani et al. (2008) correlated the proportion of omega-3 to omega-6 on sperm membrane of fertile man versus that of sterile individuals and observed half of the DHA concentration in sub-fertile males compared to fertile. Moreover, in comparing saturated and

unsaturated fatty acids, they observed that the presence of the latter on the sperm membrane of fertile man was significantly greater.

Considering that the diet of equines have soil bean and corn, both rich in n-6 and poor in omega-3, as major components (Andrade and Carmo, 2006), addition of omega-3 may bring considerable benefits to reproduction, as observed in the present trial.

The concentration of TBARs was similar between treatments, indicating that the amount of oil provided to the animals did not increase sperm susceptibility to the oxidative damage. Avanzi et al. (2011) reported TBARs of the order of $37.7 \text{ ng}/10^6$ spermatozoa in frozen-thawed semen, as the values observed in the present experiment were 22.45 and $17.1 \text{ ng}/10^6$ spermatozoa, respectively, for omega-3 supplemented or non-supplemented stallions. Those authors used only five stallions of distinct breeds, which may have caused the higher TBARs value reported.

TBARs concentration was different dependent on which period the samples were taken. There were no differences between 0, 15, 30 e 45 sampling days, however, on day 60 the concentration was nearly twice that of previous days. The higher TBARs concentration on the last day of

sampling may probably related to some chronic effect on spermatogenesis. According to McKinnon and Voss (1993), the average time spermatogonia takes to reach the spermatozoon stage is near 40 days. Thus, the spermatozoa present in the ejaculate of day 60 of the experiment were under the influence of omega-3 since they entered spermatogenesis. However, the spermatozoa collected before were in contact with the supplementation during only part of the sperm production process.

It is possible that the effects of omega-3 supplementation are more pronounced later in time than that observed in this trial, however the amount offered must be cautiously calculated to avoid increasing damage related to the membrane lipid peroxidation. Although no difference was observed between treatments, perhaps in the long run spermatozoa may become more susceptible to ROS, incorporating greater amounts of PUFA to the plasma membrane with the consequent decrease on semen quality.

Spermatozoa are constantly subject to the action of oxidative agents, even in the female reproductive tract they need to counteract the effect of oxygen reactive species which, in this case, are produced by

leukocytes (Aurich, 2005). Spermatozoa contain some enzymes that are capable of fight oxidative damage, such as glutathione peroxidase and superoxide dismutase (Kovalski et al., 1992). However, the efficiency of the process is limited in practice. Nutritional unbalances, excessive PUFAs on the diets, osmotic and thermal stresses stimulate the synthesis of a ROS quantity beyond that of which the cell is capable of neutralizing, causing irreversible damage or even death of the spermatozoon.

Conclusions

Polyunsaturated fatty acids omega-3 diet supplementation is recommended for Mangalarga Marchador breeding stallions, to increase motility in fresh and frozen-thawed semen, vigor and osmotic tolerance in frozen-thawed semen. These benefits may reflect positively on the pregnancy rate of mares and improve the utilization of stallions and the reproductive efficiency of the breed.

Acknowledgements

To the Universidade Federal de Lavras (UFLA) and to the Departments of Animal Science and Veterinary Medicine at UFLA for their support in the execution of this project. To CAPES for the doctorate scholarship. To the El Far stud and Haras do Henrique stud for all their immense support and for graciously providing the stallions of the study. To Professor Márcio Zangerônimo and Luiz Gustavo Pessoa Rocha for the inestimable laboratorial and technical support. To Professor Flamarion Tenório de Albuquerque and his team for the valuable support in the semen sampling process.

References

- Agarwal A, Saleh R, Bedaiwy M.** 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, v. 79, p. 829–843.
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D.** 2003. Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 7, p. 65–70.
- Andrade PMM, Carmo MGT.** 2006. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanóides, inflamação e imunidade. *MN–Metabólica*, Porto Alegre, v. 3, n. 8, Jul/Set, p. 135-143, 2006.

Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 65–75.

Avanizi BR, Ramos RS, Nichi M, Fioratti EG, Dell'Aqua JA, Wechsler FS, Papa FO. 2011. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. *Veterinária e Zootecnia*, v. 18, n. 2, p. 226-238.

Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Mark BC, Wilson E. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen *Theriogenology*, v. 63, p. 1519–1527.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA. 1998. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. ed. CBRA: Belo Horizonte, 49 p.

Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. 1999. Fatty acid analysis of blood, serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. asthenozoospermic males. *Lipids*, v. 34, p. 793–799.

Conquer JA, Martin JB, Tummon I, Watson L, Tekpetey F. 2000. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. *Lipids*, v. 35, p. 149–54.

Dell'Aqua JA, Papa FO, Zahn FS, Alvarenga MA, Leonardo H. 2002. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 3, p. 189-91.

García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Rodríguez AM, Bolaños JMG, Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. 2011. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 75, p. 811–818.

Glazar AI, Mutten SF, Liu J, Benson JD, Crister JK, Squires EL, Graham JK. 2009. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, v. 59, p. 201-206.

Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. 2002. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v. 58, p. 277-279.

Grady ST, Scott BD, Brinsko DW, Forrest DW, Sawyer JE, Cavinder CA. 2009. Dietary supplementation of 2 sources of omega-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 29, n.5, p. 333-33.

Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 3-22.

King SS, AbuGhazaleh AA, Webel SK, Jones KL. 2008. Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. *Journal of Animal Science*, v. 86, p. 1114-1123.

Kirk ES, Graham JK, Squires EL. 2001. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 317-318.

Kovalski NN, Lamirande E, Gagnon C. 1992. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertility and Sterility*, v. 58, p. 809-816.

Loomis PR, Graham JK. 2008. Commercial sêmen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, v. 105, p. 119-128.

Maldjian A, Penny PC, Noble RC. 2003. Docosohexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. In: De Vriese SR, Christophe AB. *Male fertility and lipid metabolism*. Champaign, IL: AOCS Press, p. 60–72.

National Research Council. 2007. *Nutrients requirements of horses*. Washington: National Academy of Sciences, 341 p.

McKinnon AO, Voss JL. 1993. *Equine reproduction*. 2. ed. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1137 p.

Mies Filho A, Dutra J, Girão RN. 1982. Congelação do sêmen ovino na primavera. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 5, p. 27- 57.

Nie GJ, Wenzel JGW. 2001. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, v. 55, p. 1005-1018.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, p. 351-358.

Papa FO, Melo CM, Dell'Aqua JA, Macedo LP, Carvalho AG, Alvarenga MA, Medeiros ASL. 2005. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 19-27.

Pope CE, Zhang YZ, Dresses BLA. 1991. Simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 22, n. 1, p. 87-95.

Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F. 2006. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction*. v, 74, p. 359-65.

Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE. 1999. *Cooled and frozen stallion semen*. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, p. 1-38 (Bulletin, 9).

Statistical Analysis Systems – SAS. 1998. *User's guide: version 6*. Cary, NC, 1686 p.

Tavilani H, Goodarzi MT, Doosti M, Raygani AV, Hassanzadeh T, Salimi S, Joshaghani HR. 2008. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive BioMedicine*, v. 16, n. 5, p. 649-656, 2008.