



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

JAILSON HONORATO PINTO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA UROSPERMIA SOBRE
A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES**

Teresina
2018

JAILSON HONORATO PINTO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA UROSPERMIA SOBRE
A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE GARANHÕES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como
parte dos requisitos necessários para obtenção do título
de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Linha de pesquisa: Morfofisiologia, Fisiopatologia,
Biotécnicas da Reprodução e Fisiopatologia do Estresse

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Teresina
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço do Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

P659a Pinto Júnior, Jailson Honorato.

Avaliação dos efeitos da urospermia sobre a viabilidade
espermática de garanhões / Jailson Honorato Pinto Júnior. -
2018.

83 – f.: il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade
Federal do Piauí, Teresina, 2018

“Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza”.

1. Equino 2. Urospermia 3. Sêmen 4. Centrifugação
5. Gradiente. I. Título

CDD 636.1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
 PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
 COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
 NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
 COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
 ATA DA DEFESA DE TESE APRESENTADA POR
 JAILSON HONORATO PINTO JÚNIOR

Aos trinta dias do mês de janeiro do ano de dois mil e dezoito, às 08:30 horas, no Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco – NUPCelt da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, Teresina-PI, a Banca Examinadora infranomeada procedeu ao julgamento da defesa de tese intitulada “**Avaliação dos efeitos da urospermia na fertilidade do garanhão**”, apresentada pelo doutorando JAILSON HONORATO PINTO JÚNIOR, da Área de Sanidade e Reprodução animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, desta Universidade. O Presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. Jose Adalmir Torres de Souza, iniciando os trabalhos concedeu a palavra ao candidato JAILSON HONORATO PINTO JÚNIOR para uma breve exposição do seu trabalho. Em seguida, o Sr. Presidente concedeu a palavra, pela ordem e sucessivamente, aos examinadores, os quais passaram a arguir o candidato durante o prazo máximo de 30 (trinta) minutos, assegurando-se à mesma igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimado a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando-o APROVADO.

	A / NAP
Prof. Dr. Jose Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI	(X) ()
Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula (Interno) / DCCV/CCA/UFPI	(X) ()
Prof. Dra. Tania Vasconcelos Cavalcante (Interna) / DCCV/CCA/UFPI	(X) ()
Prof. Dra. Deyse Naira Mascarenhas Costa (Externa) / UFT	(X) ()
Profa. Dr. Marlon De Araújo Castelo Branco (Externo) / NASSAU	(X) ()

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato JAILSON HONORATO PINTO JÚNIOR APROVADO. Nada mais havendo a tratar eu, Prof. Dr. Jose Adalmir Torres de Souza, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

Prof. Dr. Jose Adalmir Torres de Souza (Presidente) [Assinatura]

Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula Araújo [Assinatura]

Prof. Dra. Tania Vasconcelos Cavalcante [Assinatura]

Prof. Dra. Deyse Naira Mascarenhas Costa [Assinatura]

Prof. Dr. Marlon De Araújo Castelo Branco [Assinatura]

AGRADECIMENTOS

Ao *College of Veterinary Medicine* (Faculdade de Medicina Veterinária) da *University of Illinois* (Universidade do Illinois), Estados Unidos da América.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

Ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brasil.

Ao Orientador e Presidente da Banca Examinadora, Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza.

Aos Membros da Banca Examinadora, Prof. Dr. Ney Rômulo de Oliveira Paula, Prof^a. Dra. Tania Vasconcelos Cavalcante, Prof^a. Dra. Deyse Naira Mascarenhas Costa, Prof. Dr. Marlon de Araújo Castelo Branco.

A Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brasil.

A Universidade Estadual do Maranhão do Sul, Imperatriz, Brasil.

A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria, emprega tudo o que possuis na aquisição de entendimento. Exalta-a, e ela te exaltará; e; abraçando-a tu, ela te honrará.

Provérbios 4:7-8

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Causas da urospermia	14
2.2 Patogênese da urospermia	15
2.3 Sinais clínicos da urospermia	16
2.4 Diagnóstico da urospermia	18
2.5 Tratamento da urospermia	24
2.6 Efeitos da urospermia no sêmen equino	28
2.7 Efeitos do sêmen urospérmico na égua	31
2.8 Processamento de sêmen urospérmico	32
2.8.1 Centrifugação "cushioned" de sêmen urospérmico equino	32
2.8.2 Centrifugação com gradiente de densidade de sêmen equino	33
3. CAPÍTULO I	36
Efeitos da contaminação urinária sobre a capacidade de criopreservação do sêmen de garanhões	36
4. CAPÍTULO II	51
Centrifugação com gradiente de densidade e aumento da seleção de espermatozoides com morfologia normal em sêmen urospérmico de garanhões	51
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	69
ANEXO	79

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Urospermia. 12
- Figura 2. Fotomicrografia de uma amostra de sêmen contaminada com urina 18
(espermatozoides com depósitos intercalados de carbonato de cálcio).
- Figura 3.** Tubo à esquerda - garanhão com uma ejaculação normal. Tubo à direita - 18
garanhão com urospermia.
- Figura 4.** Avaliação do nitrogênio uréico em amostras de sêmen de um garanhão 21
usando uma tira de teste Azostix® (esquerda, urospermia; centro, tira de teste não
utilizada; direita, ejaculação normal)
- Figura 5.** Ejaculado de garanhão urospérmico após centrifugação. O sedimento de 28
sêmen começa na interface entre o plasma seminal amarelo e o pellet branco de sêmen
(flecha pequena). Existem cristais de urina significativos / detritos na parte inferior do
tubo (flecha grande).
- Figura 6.** Sedimento de cristal de urina no corpo do útero da égua. 31
- Figura 7.** EquiPure™ 100 mL, suspensão coloidal para sêmen equino. 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de parâmetros bioquímicos de ejaculados de equino nos grupos A e B	20
Tabela 2. Resultados de diagnóstico usando teste Azostix (n=30)	21
Tabela 3. Resultados de diagnóstico usando teste Multistix (n=30)	22
Tabela 4. Resultados de diagnóstico usando teste ácido úrico (n=30)	23
Tabela 5. Descrições dos ganhões e tratamentos atribuídos	26
Tabela 6. Efeito da contaminação urinária na motilidade do sêmen (média \pm SEM)	29
Tabela 7. Motilidade do sêmen (média \pm SEM) após adição de diluidor de sêmen (a 1: 1 ou 1: 3, sêmen: proporções de diluidor) ao sêmen contaminado com urina, com ou sem centrifugação	30
Tabela 8. Grupos de tratamento atribuídos por gradiente de densidade	35

LISTA DE ABREVIATURAS

APOPT – células espermáticas apoptóticas vivas

CASA – sistema de análise computadorizada de sêmen

CC- centrifugação com "cushion"

SLC – centrifugação em camada única

Cr – creatinina

dL – decilitros

DNA – ácido desoxirribonucléico

EE – eletro-ejaculação

ER – ejaculação retrógrada

ES – exame de ultrassom

EY – gema de ovo

HYPP – paralisia periódica hipercalêmica

IA – inseminação artificial

IM – intramuscular

IV – intravenoso

mL – mililitro

mOsm – um milésimo de osmol

MP – motilidade progressiva

MT – motilidade total

PO – via oral

QM – quarto de milha

SM – leite desnatado

UC – tratamentos sem centrifugação

UE – ureter ectópico

UI – unidades internacionais

US – urospermia

VA – vagina artificial

VIA – Viabilidade

RESUMO

Urospermia é a contaminação do sêmen com urina e uma condição que pode reduzir a fertilidade do garanhão. O objetivo foi avaliar a viabilidade do sêmen contaminado com urina através da avaliação quanto à motilidade e à função espermáticas. No primeiro experimento, foram realizadas 5 coletas de sêmen de 8 garanhões, totalizando 40 ejaculados. No segundo experimento, foram realizadas 5 coletas de sêmen de 5 garanhões, totalizando 25 ejaculados. Imediatamente após a coleta do sêmen, foi mensurado o pH, os níveis de uréia, creatinina e determinada a concentração espermática. O sêmen foi então alocado em frascos cônicos de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de sêmen bruto ao frasco "controle" (CON), 8 mL de sêmen bruto ao frasco de "baixa contaminação" (BAIXA) e 5 mL de sêmen bruto ao frasco de "alta contaminação" (ALTA). Foram adicionados 2 mL de urina a cada frasco de "baixa contaminação", e 5 mL de urina foram adicionados a cada frasco de "alta contaminação". Uma vez que o sêmen foi exposto à urina por 2 minutos, cada um dos frascos foi diluído para 40 mL com um diluidor de sêmen. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de "cushion" no fundo de cada frasco cônico. Todos os tubos foram então centrifugados. Após a centrifugação, o sobrenadante e a solução de "cushion" foram aspirados e descartados; no segundo experimento, foi preparado um gradiente de densidade em cada frasco e o gradiente centrifugado, após o que o sobrenadante foi descartado. O sedimento de sêmen remanescente foi ressuspenso para uma concentração final de 200 milhões de espermatozoides / mL. O sêmen foi então armazenado manualmente em palhetas de 0,5 mL e depois arrefecido a 5 ° C durante 20 minutos. Para congelamento, o sêmen foi então colocado a 4 cm acima do nitrogênio líquido durante 15 minutos antes de ser mergulhado em nitrogênio líquido. Em ambos os experimentos, houve uma redução significativa na motilidade total e progressiva do sêmen com aumento da contaminação da urina no pré-congelamento. No primeiro experimento, a viabilidade do sêmen pós-descongelamento foi significativamente menor no grupo ALTA do que nos grupos CON e BAIXA, enquanto que no segundo experimento, a viabilidade do sêmen pós-descongelamento foi semelhante nos grupos CON, BAIXA e ALTA. No segundo experimento, foi verificada uma maior seleção de espermatozoides morfológicamente normais após a centrifugação com o gradiente de densidade. Conclui-se que a centrifugação com "cushion" pode melhorar a qualidade do sêmen com baixa contaminação com urina e que a centrifugação com gradiente de densidade pode melhorar a qualidade do sêmen com alta contaminação por urina.

Palavras-chave: Urospermia, equino, sêmen, centrifugação, gradiente

ABSTRACT

Urospermia is the contamination of semen with urine and a condition that can reduce the fertility of the stallion. The objective was to evaluate the viability of semen contaminated with urine through evaluation of sperm motility and function. In the first experiment, 5 semen collections of 8 stallions were performed, totaling 40 ejaculates. In the second experiment, 5 semen collections of 5 stallions were performed, totaling 25 ejaculates. Immediately after semen collection, pH, urea levels, creatine and sperm concentration were measured. The semen was then allocated in 50 mL conical tubes. 10 mL of fresh semen was added to the control tube (CON), 8 mL of fresh semen was added to the "low contamination" (LOW) tube and 5 mL of fresh semen was added to the "high contamination" (HIGH) tube. 2 mL of urine was added to each LOW "low-contamination" tube, and 5 mL of urine was added to each HIGH "high-contamination" tube. Once the semen was exposed to urine for 2 minutes, each of the tubes was extended to 40 mL with a semen extender. Thereafter, 1 mL of "cushion" solution was added to the bottom of each conical tubes. All tubes were then centrifuged. After centrifugation, the supernatant and "cushion" solution were aspirated and discarded; for the second experiment, a density gradient was prepared in each tube and the gradient centrifuged, after which the supernatant was discarded. The remaining sperm pellet was resuspended to a final concentration of 200 million sperm / mL. The semen was then loaded manually into 0.5 mL straws and then cooled at 5°C for 20 minutes. For freezing, the semen was then placed 4 cm above the liquid nitrogen for 15 minutes before being dipped in liquid nitrogen. In both experiments, there was a significant reduction in total and progressive semen motility with increased pre-freeze urine contamination. In the first experiment, post-thaw semen viability was significantly lower in the HIGH group than in the CON and LOW groups, whereas in the second experiment, post-thaw semen viability was similar in the CON, LOW and HIGH groups. In the second experiment, a greater selection of morphologically normal spermatozoa was observed after centrifugation with the density gradient. It is concluded that cushion centrifugation can improve semen quality with low urine contamination and that density gradient centrifugation can improve the quality of semen with high urine contamination.

Key words: Urospermia, equine, semen, centrifugation, gradient

1. INTRODUÇÃO

A urospermia é a contaminação do sêmen com urina (BLANCHARD et al., 1990) e a contaminação de ejaculados com urina ocorre ocasionalmente durante a coleta de sêmen em muitas espécies (ALTHOUSE et al., 1989); nos garanhões pode ocorrer esporádica ou consistentemente (McDONNELL, 1992). A urospermia manifesta-se de forma individual nos diferentes garanhões, variando desde garanhões que apresentam cópula normal com ejaculação até um padrão anormal de cópula sem ou com ejaculação ocasional (LOWE, 2001). Uma cor amarela / âmbar do ejaculado sugere urospermia (KENNEY et al., 1983) (Figura 1).



Figura 1. Urospermia (McCUE, 2014).

A contaminação do sêmen bruto com urina pode resultar em danos irreversíveis ao sêmen (VOGE et al., 2016) e os efeitos deletérios da urina nos espermatozoides são devidos a alterações no pH, aumento da osmolalidade e efeitos tóxicos da ureia e outros componentes da urina (GRIGGERS et al., 2001; WIRTU et al., 2008).

A sensibilidade dos espermatozoides ao dano osmótico difere marcadamente entre as espécies, o que determina a capacidade das células de recuperar a motilidade após o estresse osmótico (GOMES-ALVES et al., 2014).

A contaminação por urina é prejudicial para a motilidade do sêmen (KIM, KIM, 1998), integridade acrossômica da membrana e reduz a sua capacidade de fertilização (SANTOS et al.,

2011), impedindo a sua utilização na inseminação artificial, reduzindo assim a fertilidade do garanhão (VOGE et al., 2016).

A urospermia tem sido associada à subfertilidade intermitente (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999) e infertilidade no cavalo e outras espécies, incluindo o homem (GRIGGERS et al., 2001). Considera-se que a subfertilidade é causada por uma ação adversa direta da urina nos espermatozoides e alteração adversa indireta da urina no pH da vagina e endométrio da égua (BLANCHARD et al 1996). Consequentemente, diminui as taxas de prenhez devido aos efeitos tóxicos da urina na função espermática (McCUE, 2014).

Embora existam casos em que pode-se evitar a mistura do sêmen com urina, muitas vezes o clínico deve gerenciar a inseminação artificial com sêmen contaminado (VOGE et al., 2016). A importância de como reverter os efeitos prejudiciais da contaminação urinária no sêmen (GRIGGERS et al., 2001), bem como a necessidade de mais estudos sobre os efeitos da urospermia na fertilidade e na melhoria da qualidade de amostras de sêmen urospérmico equino (ELLERBROCK et al., 2016) justifica a investigação. O objetivo foi avaliar a viabilidade do sêmen contaminado com urina através da avaliação quanto à motilidade, função e morfologia espermáticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em um experimento sobre componentes do plasma seminal equino na criopreservação do sêmen, foram coletados 7 garanhões de várias raças e de idade variando entre 4 a 16 anos. Cada garanhão foi coletado entre 1 e 11 vezes, mas apenas 32 ejaculados foram utilizados neste estudo. Quatro ejaculados foram excluídos do experimento porque eram de baixa qualidade para o congelamento do sêmen, (2 ejaculados apresentavam baixa porcentagem de células espermáticas e 2 ejaculados estavam contaminados com urina) (MRÁCKOVÁ, ZAVADILOVÁ, SEDLINSKÁ, 2015).

Em outra pesquisa, um sêmen equino contaminado com urina foi examinado e a motilidade progressiva foi de apenas 30%, em vez dos 85% habituais. A medição do pH e da osmolalidade do sêmen revelou valores de 7,94 e 773 mOsm, respectivamente. O pH e osmolalidade normal para o sêmen deste garanhão seriam aproximadamente 7,25 a 7,3 e 320 a 330, respectivamente (McCUE, 2014).

Um estudo com quatro garanhões avaliou o efeito do pH alterado, osmolalidade alterada e contaminação por urina na motilidade do sêmen e se a adição de diluidores de sêmen antes da centrifugação para remover a urina seria capaz de reverter os efeitos prejudiciais causados pela contaminação urinária. Foi verificada diminuição da motilidade espermática e que o uso do diluidor reverteu parcialmente os efeitos prejudiciais da urina sobre o sêmen (GRIGGERS et al., 2001).

Entre nove cavalos homocigotos com paralisia periódica hipercalêmica (HYPP), um garanhão homocigoto maduro que sobreviveu até a idade de reprodução era infértil secundário à urospermia. Este garanhão teve o sêmen testado aos 3 anos de idade. A ejaculação inicial, coletada quando o cavalo foi tratado com hidroclorotiazida mostrou urospermia. O garanhão apresentava fasciculações musculares intermitentes suaves durante a coleta. Durante todas as coletas, quando o garanhão não estava recebendo nenhum medicamento, ele criou vocalizações anormalmente elevadas. O cavalo estava relutante ou incapaz de se mover por 3 ou 4 minutos após a ejaculação e teve leve tremores musculares. Alguns episódios de micção no ejaculado foram acompanhados de decúbito (NAYLOR et al., 1999).

Em outras coletas com o cavalo não medicado, foi encontrada urospermia leve com motilidade e morfologia aceitáveis do sêmen. A urospermia não tinha sido relatada anteriormente e pode indicar que os garanhões homocigotos terão problemas de infertilidade. É provável que os episódios induzidos por excitação de HYPP resultem em fraqueza e incompetência do músculo estriado do esfíncter da bexiga e, portanto, vazamento de urina na ejaculação. A evidência sugere que os homocigotos são mais severamente afetados do que os heterocigotos e a condição deve ser considerada como co-dominante. Isso ressalta ainda a necessidade de remover esse defeito da população de cavalos (NAYLOR et al., 1999).

Nos Estados Unidos, a prevalência foi de 1,5% e 5% em cavalos Quarto de Milha e Paint Horses, respectivamente (TRYON et al., 2009). No Brasil, a prevalência da HYPP em cavalos Quarto de Milha foi de 4,2% (DELFIOL et al., 2015).

2.1 Causas da urospermia

As causas de urospermia em garanhões não estão bem definidas. A patologia pode desenvolver-se como uma desordem isolada ou pode estar associada a outras anormalidades neurológicas primárias, como a mieloencefalite protozoária equina, o herpesvírus equino 1 e a

toxicose do sorgo, bem como condições clínicas tais como paralisia periódica hipercalêmica, cistite e urolitíase. A urospermia também pode se desenvolver secundariamente a fraturas, osteomielite e neoplasia. Além disso, alguns casos não parecem estar associados a uma condição patológica específica e podem ser de origem comportamental (BLANCHARD et al., 1990, MAYHEW et al., 1990; TURNER et al., 1995; McCUE, 2014). A urospermia também pode ocorrer como disfunção reprodutiva nos casos de lesão da cauda equina (TUTKO et al., 2002).

A urospermia é mencionada como uma desordem ejaculatória causada pela falha no colo da bexiga no momento da ejaculação (VARNER et al., 2000). O fechamento inadequado do esfíncter pode resultar de causas mecânicas, como a fibrose, ou por causas neurogênicas (TURNER et al., 1995; VARNER et al., 1991). Esta pode ser uma condição transitória em garanhões excessivamente excitados durante as primeiras ejaculações. No entanto, na maioria dos casos de urospermia transitória ou permanente, os espermatozoides são facilmente observados (ESTRADA et al., 2003).

É possível que, sob certas circunstâncias, as fibras nervosas simpáticas hipogástricas inervando o sistema ejaculatório e a bexiga sejam estimuladas simultaneamente, resultando em urina durante a ejaculação (LOWE, 2001). Como o controle da micção, ereção e ejaculação é orquestrado por atividade parassimpática e simpática, qualquer lesão aos componentes pertencentes ao sistema nervoso autônomo pode resultar em urospermia (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999).

O sêmen contaminado pela urina (dentro da bexiga urinária) também pode ocorrer durante a ejaculação retrógrada (BRINSKO, 2001).

2.2 Patogênese da urospermia

Pouca informação está disponível sobre a patogênese da urospermia (MAYHEW et al., 1990), mas pode envolver falha na oclusão do esfíncter da bexiga e um distúrbio funcional nos componentes do complexo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático que controlam a micção, a ereção e a ejaculação (LEEDERTSE et al., 1990; HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999).

Os vários locais de lesões potenciais que podem interferir com a ejaculação e causar o aparecimento de urina no ejaculado incluem os nervos aferentes e eferentes que inervam as estruturas da bexiga e da uretra, as vias aferentes e proprioceptivas viscerais ascendentes e os

caminhos do neurônio motor eferente autônomo e somático descendente dentro da medula espinhal e tronco cerebral. Essas vias e seu reflexos associados, atividade voluntária e involuntária são muito complexas (MAYHEW, 1990).

Os distúrbios da medula espinhal não foram especificamente incriminados em causar urospermia, mas foram associados a padrões de micção anormais e, portanto, deve ser realizada uma avaliação completa da marcha do cavalo. A etapa específica do exame neurológico que deve ser realizada com algum detalhe é a avaliação dos sinais obtidos da cauda, do ânus e do reto. A avaliação do tônus da cauda e do reflexo anal devem ser avaliados criticamente. A evidência de atrofia muscular e sudorese localizada na região glútea e perineal deve ser examinada. Isso ocorre porque os distúrbios do neurônio motor inferior nesta região são a causa neurológica mais provável de micção durante a ejaculação. Isso pode estar associado a 1) uma lesão do neurônio motor inferior que afeta a saída simpática lombar para o nervo hipogástrico controlando o tônus muscular alfa-adrenérgico ou 2) uma lesão sacral que afeta a saída eferente somática para o nervo podendo que, por meio de receptores colinérgicos, mantém o tônus muscular estriado uretral (MAYHEW, 1990).

No entanto, a maioria dos casos de urospermia em garanhões é de natureza idiopática (TURNER, 2007).

2.3 Sinais clínicos da urospermia

Um garanhão com micção persistente durante a ejaculação não mostra outras anormalidades do sistema urogenital. Observa-se que a urina é liberada na ejaculação em várias ocasiões. A posição do cavalo ao urinar deve ser normal. O estado endócrino do garanhão não revela anormalidades como demonstrado pelo soro normal, concentração de testosterona em repouso e por um teste normal de estimulação com testosterona (TURNER et al., 1995; COX, 1975).

Como parte de uma avaliação comportamental completa, o cavalo pode ser filmado em sua baia por um período de 24 horas. A postura do cavalo durante a micção e a frequência e fluxo de micção podem ser normais. Frequência, duração e controle do pênis, também são normais. Frequência e postura de defecação são igualmente normais. Se o garanhão se inclina na parede da baia em uma postura incomum, sugere um ligeiro déficit neurológico. A incontinência urinária

pode não ser observada durante o período de 24 horas em que é filmado ou em qualquer momento durante a sua estadia (TURNER et al., 1995).

A libido do garanhão é boa. Ele desenvolve e mantém uma ereção e monta normais, mas não consegue se acasalar bem durante a impulsão. Durante a primeira coleta de sêmen, o ejaculado do garanhão é normal, mas a ejaculação é imediatamente seguida de micção, que contamina a ejaculação com aproximadamente 20 mL de urina e 20 mL de areia como sedimento de urina. Isso faz com que o ejaculado apareça opaco e seja fétido. O número de células espermáticas móveis normais é relatado como inferior ao ideal (KENNEY et al., 1993).

Uma hora depois, um segundo ejaculado pode ser coletado pelo uso de uma vagina artificial na tentativa de obter jatos de sêmen sem urina e determinar em que momento durante a ejaculação a urina é emitida. Todos os jatos desta ejaculação fracionada podem ser grosseiramente normais, aparecendo branco translúcido sem sedimento de urina óbvio. A motilidade inicial pode ser de 40% total e 30% progressiva (TURNER et al., 1995).

As vesículas seminais, ampola e próstata são normais na palpação pelo reto (LEEDERTSE et al., 1990). A bexiga urinária, glândulas sexuais acessórias, aorta caudal e artérias ilíacas devem ser examinadas por palpação e ultrassonografia pelo reto; nenhuma anormalidade deve ser aparente. A bexiga pode não ser evidente manualmente pelo reto, o que indica a presença de algum esfíncter funcional. A palpação e a ultrassonografia pelo reto novamente devem ser realizadas e, apesar do comportamento de urinar voluntário aparentemente normal, a urina e os sedimentos podem permanecer na bexiga, suspeitando-se de uma dissinergia do músculo esfíncter do detrusor (TURNER et al., 1995).

Uma pequena quantidade de cristais de urina pode ser detectada durante a avaliação do sêmen, visíveis em um esfregaço ao microscópio (Figura 2) (LEEDERTSE et al., 1990).

Um exame neurológico completo não revela deficits aparentes além do trato urinário. Especificamente, a função do nervo craniano, a função dos membros posteriores, o tônus anal, o reflexo anal, o tônus da cauda e a defecação são considerados normais. Não há áreas de hipotalgesia cutânea (TURNER et al., 1995).

Os garanhões com menor desenvolvimento sacral podem ser impotentes devido a ereções incompletas e estéreis devido à urospermia (DeBOWES, 1990).

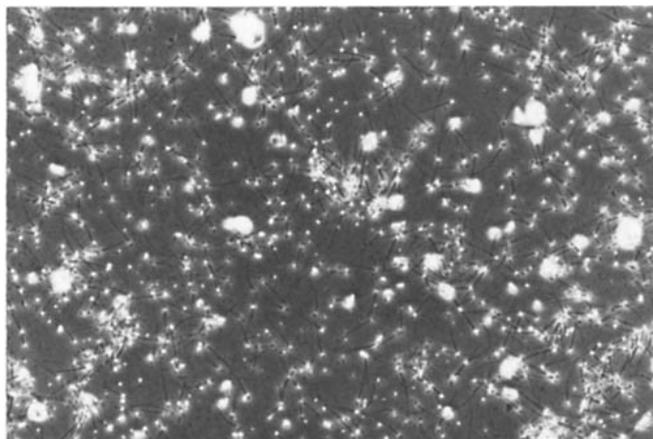


Figura 2. Fotomicrografia de uma amostra de sêmen contaminada com urina (espermatozoides com depósitos intercalados de carbonato de cálcio) (LEEDERTSE et al., 1990).

2.4 Diagnóstico da urospermia

A urospermia é mais provável de ocorrer com garanhões que não conseguem ejacular prontamente (McKINNON, 2013) e o diagnóstico baseia-se nas características físicas, como odor de urina, aumento do volume (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999) e cor variando de amarelo a âmbar (KENNEY et al., 1983) ou cor amarela pálida a amarela escura (ALTHOUSE et al., 1989; BALL, 2008) (Figura 3).



Figura 3. Tubo à esquerda - garanhão com uma ejaculação normal. Tubo à direita - garanhão com urospermia (DASCANIO, 2014).

A cor não é apenas influenciada pela contaminação por urina, mas também pela concentração do sêmen, o diluidor utilizado e a limpeza da ejaculação. A falta de lavar adequadamente o pênis e remover o esmegma antes da coleta pode resultar em detritos na ejaculação e uma mudança de cor (ELLERBROCK et al., 2016).

Do mesmo modo, o odor é uma ferramenta de diagnóstico pobre para pequenas quantidades de contaminação urinária, mas é altamente específico para quantidades moderadas a altas de contaminação por urina em sêmen bruto e refrigerado. Além disso, o odor pode ser influenciado pelo garanhão, diluidor utilizado ou falha na avaliação do odor após a coleta (ELLERBROCK et al., 2016).

O nível de contaminação do sêmen por urina também pode ser avaliado pelo valor de pH do ejaculado e resultados superiores a 8.0, podendo até mesmo atingir 8.5, indicam a presença de urina na amostra (CARY et al., 2004; JASKO, 1992).

No entanto, a cor, o odor e o pH do sêmen não são testes confiáveis para a detecção de pequenas quantidades de contaminação urinária em amostras amplamente arrefecidas, mas uma tira de teste comercial de nitrogênio ureico pode detectar a presença de pequenas concentrações de urina em amostras de sêmen bruto e com graus moderados de contaminação por urina em amostras prolongadamente resfriadas (ELLERBROCK et al., 2016).

Em outros casos, a urospermia pode ser mais difícil de detectar e requer o uso de ensaios de ureia ou creatinina (BALL, 2008).

A ureia e a creatinina são marcadores bem conhecidos para a detecção de urina no ejaculado (MRÁCKOVÁ, ZAVADILOVÁ, SEDLINSKÁ, 2015) (Tabela 1). A análise bioquímica revela concentrações elevadas de ureia e creatinina no plasma seminal e diminuição das concentrações de espermatozoides no ejaculado (VOSS, McKINNON, 1993).

As concentrações de ureia acima de 5 mmol / litro ou de creatinina acima de 177 μ mol / litro no sêmen são ditas serem diagnósticas (BOYLE, 1990).

Porém, as determinações de nitrogênio ureico e / ou creatinina requerem equipamentos de laboratório dispendiosos, técnicos treinados e tempo e, portanto, não têm valor imediato para o clínico no campo (ALTHOUSE et al., 1989).

Tabela 1. Valores médios de parâmetros bioquímicos de ejaculados de equino nos grupos A e B (MRÁCKOVÁ, ZAVADILOVÁ, SEDLINSKÁ, 2015)

	Grupo A – boa viabilidade de congelamento (ejaculados com motilidade pós-descongelamento $\geq 35\%$)	Grupo B – má viabilidade de congelamento (ejaculados com motilidade pós-descongelamento $\leq 35\%$)
Parâmetro	Média \pm SD	Média \pm SD
Creatinina ($\mu\text{mol/l}$)	54,3 \pm 19,42	53,2 \pm 21,23
Ureia (mmol/l)	6,7 \pm 0,91	6,2 \pm 1,26

$p \leq 0,05$

A identificação de um método rápido e confiável para determinar a presença de urina nos ejaculados seria benéfico para diagnóstico imediato. Um teste poderia ser usado como um procedimento de triagem para análises posteriores mais extensas e dispendiosas de amostras coletadas. Além disso, a análise da contaminação urinária nos ejaculados não rotineiramente implementada em exames de ultrassonografia e protocolos diários de avaliação do sêmen poderia ser executada com facilidade e sem maiores custos. Tal teste também poderia fornecer informações adicionais sobre um determinado animal e um ejaculado particular em questão (ALTHOUSE et al., 1989).

As amostras de sêmen equino podem ser analisadas usando o kit de teste Azostix, Multistix ou ácido úrico. O teste de diagnóstico Azostix contém uma tira reagente que é sensível ao nitrogênio ureico. Todas as amostras de urina / sêmen e controle são gentilmente agitadas várias vezes antes do teste. A tira reagente Azostix é então imersa no controle ou na amostra contaminada com urina e imediatamente removida. A tira é mantida em posição horizontal e enxaguada com água destilada. Posteriormente, o exame visual para uma mudança de cor é feito em intervalos de 5 segundos durante 1 minuto (ALTHOUSE et al., 1989) (Tabela 2).

Uma mudança de cor (amarelo a verde) é observada dentro de 10 segundos nos ejaculados que apresentaram concentrações de nitrogênio ureico superiores a 39 mg / dL. (ALTHOUSE et al., 1989).

Tabela 2. Resultados de diagnóstico usando teste Azostix (n=30) (ALTHOUSE et al., 1989)

Concentração de urina (%)	Nº de tiras que mudam de cor ao longo do tempo (segundos)							
	(0)	(5)	(10)	(15)	(20)	(25)	(30)	(35-60) ^a
0	0	0	0	2	6	11	16	21
10	0	16	28	29	30	30	30	30
20	0	23	30	30	30	30	30	30
30	2	30	30	30	30	30	30	30
40	4	30	30	30	30	30	30	30
50	7	30	30	30	30	30	30	30

^a A leitura foi realizada em intervalos de 5 segundos.

O fabricante do Azostix (Figura 4) recomenda que se aguarde pelo menos 60 segundos para ler a tira de teste contra a escala fornecida na parte de trás do recipiente. Azostix é altamente sensível e específico quando usado para diagnosticar contaminação de urina em sêmen resfriado, independentemente da porcentagem de contaminação urinária (ELLERBROCK et al., 2016).



Figura 4. Avaliação do nitrogênio uréico em amostras de sêmen de um garanhão usando uma tira de teste Azostix® (esquerda, urospermia; centro, tira de teste não utilizada; direita, ejaculação normal) (DASCANIO, 2014).

Outro teste diagnóstico, o Multistix, contém 10 tiras reagentes que podem detectar glicose, bilirrubina, cetonas, gravidade específica, sangue, pH, proteína, nitritos, urobilinogênio e leucócitos em uma amostra. O Multistix é testado por imersão da tira de reagente no controle ou na amostra contaminada com urina e depois removida. A tira é mantida em uma posição horizontal para evitar a mistura de produtos químicos das áreas de reagente adjacentes. O Multistix é examinado para uma mudança de cor em intervalos de 15 segundos durante 1 minuto e posteriormente em intervalos de 30 segundos por mais 3 minutos (ALTHOUSE et al., 1989) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados de diagnóstico usando teste Multistix (n=30) (ALTHOUSE et al., 1989)

Concentração de urina (%)	Nº de tiras que mudam de cor ao longo do tempo (segundos)				
	(0-60) ^a	(90)	(120)	(180)	(210-240) ^b
0	0	0	0	0	0
10	0	0	17	24	30
20	0	6	28	30	30
30	0	6	19	30	30
40	0	9	27	30	30
50	0	10	28	30	30

^a As leituras foram realizadas em intervalos de 15 segundos.

^b As leituras foram realizadas em intervalos de 30 segundos.

Os testes Azostix e Multistix detectam com sucesso a urina no ejaculado de equino (ALTHOUSE et al., 1989) e são métodos altamente específicos e sensíveis para avaliar a contaminação urinária em sêmen de garanhão bruto, diluído e resfriado (ELLERBROCK et al., 2016).

Para detecção da contaminação urinária no sêmen, ainda pode ser realizado o teste de ácido úrico. Esse teste é realizado adicionando-se 0,3 mL do controle ou da amostra de sêmen contaminada com urina a um frasco contendo os reagentes de teste pré-misturados de ácido fosfotungístico e um tampão de cor. O frasco é agitado suavemente e examinado para uma mudança de cor em intervalos de 15 segundos durante 1 minuto e subsequentemente a intervalos de 30 segundos durante 3 minutos adicionais (ALTHOUSE et al., 1989) (Tabela 4).

O sêmen não deve conter cristais de carbonato de cálcio ou outros sedimentos minerais. A pressão osmótica do plasma seminal contaminado com urina é aumentada devido a constituintes osmoticamente ativos de urina (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999).

Um exame retal deve incluir a avaliação do tônus retal e do volume residual de urina após a micção e uma palpação completa do conteúdo pélvico com especial atenção à superfície ventral do sacro, onde as fraturas podem ser detectadas. Com lesões da raiz do nervo sacral, uma perda abrupta de tônus retal pode ser palpada quando a mão é movimentada do reto proximal ao distal (MAYHEW, 1990).

Tabela 4. Resultados de diagnóstico usando teste ácido úrico (n=30) (ALTHOUSE et al., 1989)

Concentração de urina (%)	Nº de tiras que mudam de cor ao longo do tempo (segundos)	
	(0)	(15-240) ^a
0	23	30
10	30	30
20	30	30
30	30	30
40	30	30
50	30	30

^a As leituras foram realizadas em intervalos de 15 segundos até 1 min e intervalos de 30 segundos para os 3 minutos restantes.

Para os ganhões que, aparentemente, não conseguem ejacular ou para ejaculados que contêm volumes seminais inferiores ou números de espermatozoides mais baixos do que o esperado, a obtenção de uma amostra de urina após a ejaculação através de cateterismo da bexiga é um procedimento de diagnóstico simples que pode ser usado para investigar a possibilidade de ejaculação retrógrada (BRINSKO, 2001).

2.5 Tratamento da urospermia

Poucos estudos foram relatados sobre urospermia e seu tratamento em garanhões (GRIGGERS et al., 2001) e a maioria dos casos é de natureza idiopática, limitando assim as opções terapêuticas (VOGE et al., 2016). As terapias direcionadas para reduzir a contaminação urinária incluem a redução da quantidade de urina na bexiga antes da reprodução, a coleta de apenas a porção rica em sêmen da ejaculação usando uma vagina artificial de ponta aberta ou o tratamento farmacológico para aumentar o fechamento do colo da bexiga durante a ejaculação ou (TISCHNER et al., 1974).

Entre essas opções terapêuticas limitadas disponíveis para o tratamento da urospermia em garanhões, nenhuma foi consistentemente satisfatória. Incentivar o cavalo a urinar imediatamente antes da ejaculação foi sugerido (LEENDERTSE, et al., 1990) e as técnicas para induzir a micção em garanhões incluem o alojamento em baia recém-acamada, a colocação de fezes de outro garanhão na tenda do garanhão afetado e o uso de diuréticos (LEENDERTSE, et al., 1990; HELD, et al., 1992). O fracionamento do ejaculado também foi sugerido como um meio para gerenciar a urospermia. Teoricamente, uma ejaculação livre de urina poderia ser obtida coletando apenas os jatos sem urina (VARNER, et al., 1991; NASH, et al., 1980). Esta técnica pode ser satisfatória se a contaminação com urina ocorrer apenas nos jatos finais da ejaculação. Infelizmente, o padrão de contaminação urinária durante a ejaculação nem sempre é repetido em um indivíduo afetado (TURNER et al., 1995).

O garanhão afetado pode ser alojado na baia de outro garanhão que ainda continha uma pilha fecal desse outro garanhão. Inicialmente, o garanhão afetado parece ficar muito ansioso por estar na baia de outro garanhão. No entanto, após aproximadamente 3 minutos, o cavalo cheira a pilha fecal do outro garanhão, posa sobre ele e urina na pilha fecal do outro garanhão (McCUE, 2014).

O garanhão será então imediatamente levado para o galpão de reprodução e o sêmen coletado sem contaminação com urina. O ciclo de mover o garanhão para outra baia e permitir que ele urine deve ser repetido três vezes em todos os outros dias. A ejaculação normal na ausência de contaminação urinária ocorrerá durante cada procedimento de coleta e será normal desde então (McCUE, 2014).

Outra técnica de manejo que pode ser empregada para incentivar um garanhão a urinar antes da coleta de sêmen é remover o garanhão de sua baia normal, limpar a baia, colocar cama

fresca e, em seguida, devolver o cavalo a sua baia. A maioria dos garanhões urinarão dentro de alguns minutos para marcar seu território (McCUE, 2014).

O manejo do garanhão durante o período remanescente da reprodução implica atrasar o acasalamento da égua até imediatamente após a micção. Isso pode ser conseguido pela administração de um diurético seguido de exposição a estímulos urinários 30 minutos mais tarde. Isso inclui a caminhada do garanhão em torno de um pasto com uma égua no estro, assobiando para o garanhão ou agitação da água de beber enquanto ele estiver em sua baia. Quando o garanhão tiver urinado, a égua é trazida (LOWE, 2001).

Doze horas após o acasalamento, as éguas são reexaminadas por ultrassonografia para evidências de fluido uterino não presente antes do acasalamento e possivelmente associado à micção durante o coito. Se presente, a égua é tratada com uma lavagem uterina de grande volume com 3 L de solução salina isotônica (NaCl 0,9%) infundida através de um cateter de lavagem uterina e aplicada 20 UI de oxitocina IM. A égua é então reexaminada 2 horas depois (LOWE, 2001).

O tratamento de garanhões com urospermia (Tabela 5) inclui diuréticos, agonistas de α -adrenoceptores, antagonistas de β -adrenoceptores, antidepressivos tricíclicos, antagonistas de receptores muscarínicos parassimpáticos, agonistas de receptores parassimpáticos muscarínicos e hormônios. Estas drogas destinam-se a (1) promover a evacuação da bexiga antes da ejaculação; (2) aumentar o tônus do esfíncter uretral externo durante a ejaculação para evitar a contaminação do sêmen pela urina; ou (3) alterar a produção de urina (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999).

O uso de diuréticos pode ser útil se o garanhão esvaziar completamente sua bexiga antes da ejaculação, mas pode resultar em um grande volume de urina diluída depositada na ejaculação que seria prejudicial para a fertilidade (GRIGGERS et al., 2001).

Os antidepressivos tricíclicos, como a imipramina, foram utilizados como terapia para a urospermia em garanhões em um esforço para aumentar o tônus do esfíncter da bexiga (McDONNELL, 1992) e o esfíncter uretral externo durante a ejaculação (TURNER et al., 1995).

O proprietário deve administrar 500 mg de imipramina na ração 2 a 3 horas antes da coleta de sêmen e coletar sêmen imediatamente após o garanhão ter urinado. Se o primeiro ejaculado tiver contaminação bruta de urina, um segundo ejaculado deverá ser coletado 10 a 15 minutos depois (TURNER et al., 1995).

A imipramina também parece aumentar a contratilidade do colo da bexiga durante a emissão de urina. O mecanismo de ação não é completamente compreendido, mas aparentemente

os antidepressivos tricíclicos e seus metabólitos promovem a atividade α -adrenérgica inibindo a recaptação da norepinefrina (McDONNEL, 1992). Por outro lado, um teste com três garanhões que exibiam urospermia não demonstrou nenhum efeito benéfico da imipramina na subsequente bioquímica do plasma seminal, incluindo a concentração de ureia e creatinina (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999). Esses medicamentos também podem ser usados para diminuir a frequência de ejaculação retrógrada (BRISKO, 2001).

Tabela 5. Descrições dos garanhões e tratamentos atribuídos (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999.)

No	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Tratamento		
				1	2	3
1	Anglo-Arabe	19	415	Betanecol ^a 0.07 mg/kg PO	Imipramina ^b 750 mg PO	Furosemida ^c 30 mg IV
2	Quarto de Milha	19	540	Imipramina 750 mg PO	Furosemida 30 mg IV	Betanecol 0.07 mg/kg PO
3	Aztec	8	515	Furosemida 30 mg IV	Betanecol 0.07 mg/kg PO	Imipramina 750 mg PO

IV, intravenoso; PO, via oral

^a Betanecol, 5 mg/tablet; Sidnak, East Hanover, NJ, USA

^b Tofranil, 25 mg/tablet; Geigy Pharmaceuticals, Division of Ciba-Geigy, Ardsley, NY, USA

^c Lasix, 50 mg/mL; Quimica Hoechst de Mexico, S.A. de C.V., Mexico, DF

Em uma tentativa adicional de controlar a urospermia, a administração de fenilpropanolamina, outro agente α -adrenérgico, foi administrada (0,35 mg / kg) na alimentação 2 vezes ao dia durante 14 dias, sem melhora aparente (TURNER et al., 1995).

Como a micção durante a ejaculação geralmente é intermitente em garanhões, o sucesso é muitas vezes evasivo (VOSS, McKINNON, 1993). A resposta ao tratamento deve ser avaliada individualmente (HOYOS SEPÚLVEDA et al., 1999).

Os diluidores de sêmen são comumente usados em IA equina para prolongar a viabilidade do sêmen e inibir o crescimento bacteriano, mas o uso de um diluidor de sêmen pode ser benéfico também no alívio dos efeitos negativos da urina na motilidade espermática. A recuperação da motilidade progressiva do sêmen, reduzida pela contaminação urinária, depende do diluidor utilizado para diluir o sêmen (GRIGGERS et al., 2001).

Quando a contaminação com urina é substancial, o sêmen deve ser misturado com um volume igual de diluidor de sêmen e centrifugado por 10 minutos a 400 x g. A centrifugação separará o plasma seminal, espermatozoides e qualquer sedimento de urina (Figura 5) (DASCANIO, WITONSKY, 2005).

Embora se possa esperar que a centrifugação ofereça um benefício adicional, reduzindo a quantidade de urina que contamina o sêmen, a centrifugação do ejaculado e a ressuspensão com o diluidor bruto não têm nenhuma vantagem sobre a simples adição de diluidor. É possível que a exposição dos espermatozoides a uma maior concentração de cristais de urina, que seria centrifugada no sedimento junto com os espermatozoides, poderia causar danos adicionais às células e inibir qualquer efeito benéfico da centrifugação. Além disso, uma potencial desvantagem da centrifugação é a possível perda de alguns espermatozoides viáveis no sobrenadante descartado se o procedimento não for realizado corretamente; por exemplo, remoção rápida do sobrenadante após a término do processo de centrifugação. Embora a centrifugação seja uma técnica valiosa para remover plasma seminal indesejável para alguns ganhões inférteis, ainda não está clara nos casos de urospermia (GRIGGERS et al., 2001).

Na criopreservação de sêmen em muitas espécies, a centrifugação dos ejaculados é necessária para remover os fluidos seminais, aumentar a concentração de sêmen e recuperar amostras contaminadas com urina (ALVAREZ et al., 2012).

Quando esses tratamentos são infrutíferos, é tentada a minimização dos efeitos tóxicos da urina no sêmen. O tratamento do sêmen contaminado com urina por centrifugação "cushioned" / ressuspensão pode melhorar alguns dos efeitos adversos da urospermia na fertilidade, mantendo a integridade da membrana espermática, mas os ganhões variam em sua resposta a esses tratamentos (VOGE et al., 2016).

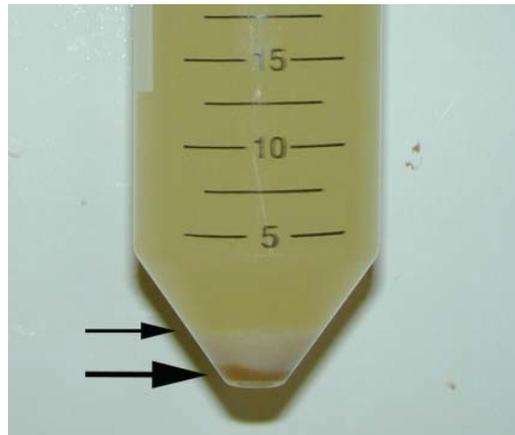


Figura 5. Ejaculado de garanhão urospérmico após centrifugação. O sedimento de sêmen começa na interface entre o plasma seminal amarelo e o pellet branco de sêmen (flecha pequena). Existem cristais de urina / detritos na parte inferior do tubo (flecha grande) (DASCANIO, 2014).

2.6 Efeitos da urospermia no sêmen equino

Poucos estudos foram feitos relatando os efeitos da urospermia sobre as alterações no pH, osmolalidade e motilidade do sêmen de equino, mas foi relatado que uma condição urospérmica que leva a uma solução hiperosmolar é prejudicial à motilidade dos espermatozoides em cavalos (GRIGGERS et al., 2001). Acredita-se que os espermatozoides possam sofrer capacitação em meios com maior força iônica. Assim, sem ajuste do ejaculado, os espermatozoides no sêmen contaminado com urina podem sofrer uma capacitação e reação do acrossoma prematuras, resultando em diminuição da fertilidade (DASCANIO, WITONSKY, 2005).

A adição de urina diluída (obtida após administração de furosemida) ao sêmen para produzir uma mistura de 5% (v: v) tem pouco efeito sobre a osmolalidade ou o pH, aumentando de 312 para 316 mOsm e 7,71 para 7,80, respectivamente, e não afetam significativamente a motilidade imediatamente após o tratamento ou após 1 hora. Maiores volumes de urina diluída e todos os volumes de urina coletados por cateterização resultam em aumento considerável da osmolalidade e do pH, diminuindo significativamente a motilidade imediatamente após o tratamento (GRIGGERS et al., 2001).

A adição de 50% de urina diluída ou qualquer quantidade de urina coletada por cateterização resultou em uma redução imediata da motilidade progressiva inicial de 116% para 64%. O efeito da adição de 33 ou 50% de urina cateterizada resultou em uma redução imediata

para 5% e 0% de motilidade progressiva, respectivamente. Não há indicação clara se as condições ácidas ou básicas são mais prejudiciais para a motilidade do sêmen de equino, mas a urina é prejudicial para a motilidade do sêmen em quase todos os casos. Somente quando uma pequena quantidade (5%) de urina diluída foi adicionada à ejaculação, não houve efeito aparente na motilidade. Qualquer quantidade de urina "normal" ou maiores quantidades de urina diluída reduzem a motilidade (GRIGGERS et al., 2001) (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da contaminação urinária na motilidade do sêmen (média \pm SEM) (GRIGGERS et al., 2001)

Tratamento	pH	Osmolalidade	Motilidade T0	Motilidade T1
Controle	7.71 \pm 12	312.1 \pm 7.6	64 \pm 11 ^a	36 \pm 11 ^a
5% urina diluída	7.80 \pm 12	315.8 \pm 6.8	58 \pm 13	21 \pm 7
10% urina diluída	7.85 \pm 13	322.1 \pm 8.6	36 \pm 12 ^b	28 \pm 14
33% urina diluída	7.95 \pm 12	333.6 \pm 15.6	26 \pm 12 ^b	9 \pm 6
50% urina diluída	8.20 \pm 08	360.1 \pm 13.2	13 \pm 7 ^b	4 \pm 4
5% urina normal	7.84 \pm 11	346.3 \pm 12.6	16 \pm 4 ^b	6 \pm 3
10% urina normal	7.88 \pm 11	380.6 \pm 6.3	12 \pm 4 ^b	8 \pm 4
33% urina normal	8.01 \pm 06	490.1 \pm 7.0	5 \pm 4 ^b	1 \pm 0 ^b
50% urina normal	8.14 \pm 04	668.8 \pm 9.8	0 \pm 0 ^b	0 \pm 0 ^b

T0 – imediatamente após o tratamento; T1 – 1 hora após o tratamento

Valores dentro de colunas com sobrescritos diferentes são diferentes. ^{a,b} P < 0.05

Outros estudos preliminares revelaram que a adição de urina ao sêmen antes da adição de diluidor resultaram em uma redução acentuada na motilidade espermática (VOGE et al., 2016), afetando a motilidade inicial e a motilidade do sêmen após 24 horas de resfriamento, mesmo quando existe uma pequena quantidade de urina. A contaminação por urina tem um efeito mais pronunciado sobre a redução da motilidade espermática no sêmen bruto, em comparação com as amostras armazenadas refrigeradas e diluídas. A adição ao sêmen com um diluidor comercial de sêmen baseado em proteína de leite pode corrigir os efeitos prejudiciais de uma solução hipertônica e pH alcalino. No entanto, mesmo uma pequena quantidade de contaminação por urina (menos de 10% do volume total de sêmen) tem efeitos deletérios sobre a motilidade do

sêmen e pode passar despercebida pelo processamento e transporte de sêmen (ELLERBROCK, et al., 2016).

A centrifugação do sêmen contaminado com urina e a ressuspensão com novas quantidades de diluidor não melhoram a motilidade acima. O diluidor de leite desnatado restaura a motilidade melhor do que o diluidor de gema de ovo a uma proporção de 1: 3 imediatamente após a adição e em qualquer proporção quando centrifugada. Além disso, o diluidor de leite desnatado continua a fornecer motilidade superior em comparação com o diluidor de gema de ovo nessas circunstâncias 1 hora após centrifugação e ressuspensão (GRIGGERS et al., 2001) (Tabela 7).

Tabela 7. Motilidade do sêmen (média \pm SEM) após adição de diluidor de sêmen (a 1: 1 ou 1: 3, sêmen: proporções de diluidor) ao sêmen contaminado com urina, com ou sem centrifugação (GRIGGERS et al., 2001).

Tratamento	Motilidade T0	Motilidade T1
Bruto (sem urina)	44 \pm 16	38 \pm 15 ^a
Bruto (com urina)	11 \pm 6 ^a	1 \pm 0 ^b
Ext EY 1:1	28 \pm 8	28 \pm 7 ^a
Ext EY 1:3	22 \pm 11 ^c	24 \pm 12 ^a
Ext EY 1:1 (cent)	22 \pm 10 ^c	21 \pm 4 ^{a,c}
Ext EY (cent)	20 \pm 12 ^c	23 \pm 6 ^{a,c}
Ext SM 1:1	36 \pm 4 ^b	31 \pm 9 ^a
Ext SM 1:3	51 \pm 6 ^{b,d}	56 \pm 6 ^a
Ext SM 1:1 (cent)	46 \pm 6 ^{b,d}	49 \pm 5 ^{a,d}
Ext SM (cent)	59 \pm 9 ^{b,d}	44 \pm 10 ^{a,d}

T0 – imediatamente após o tratamento; T1 – 1 hora após o tratamento

Valores dentro de colunas com sobrescritos diferentes são diferentes. ^{a,b} P < 0.05; ^{c,d} P < 0.05

EY: gema de ovo; SM: leite desnatado-polimixina 6

A qualidade do DNA do sêmen diminuiu à medida que a contaminação com urina aumentou. Este efeito foi imediatamente aparente (T0), mas tornou-se mais pronunciado com o aumento do tempo de armazenamento do sêmen resfriado (VOGE et al., 2016).

Os efeitos da urospermia na motilidade ou na fertilidade do sêmen de garanhão resfriado não foram documentados. Na prática, os ejaculados contaminados com urina podem ser comercializados devido à falta de conhecimento do pessoal que coleta e processa o sêmen ou por

razões fraudulentas sem divulgação ao praticante de reprodução que gerencia a égua. Continua desconhecido se a contaminação por urina pode ser devidamente diagnosticada em sêmen prolongadamente resfriado usando-se meios comuns para avaliar a contaminação urinária (ELLERBROCK, et al., 2016).

2.7 Efeitos do sêmen urospérmico na égua

A contaminação urinária do sêmen também pode causar diminuição das taxas de concepção devido à possível inflamação induzida no útero por componentes urinários. Os efeitos da urina no endométrio foram extrapolados dos efeitos encontrados nas éguas com refluxo vesico-vaginal (DASCANIO, WITSKY, 2005).

A urina no útero pode resultar do refluxo vesico-vaginal e subsequente fluxo para a frente através de um colo aberto e também pode ocorrer por contaminação por um garanhão que possui urospermia. (GRIGGERS et al, 2001). Além disso, a urina no útero cria uma endometrite química e, se persistir, interferirá com a manutenção da gravidez. A urina no útero da égua é identificada por acumulações hiperecóicas mais comumente na junção corpórea corneana e não se arrasta facilmente com a sonda. Parece que a ecogenicidade da urina é uma combinação de cristais e muco. A urina no útero deve ser removida com lavagem volumosa (McKINNON, McCUE, 2013).

A ultrassonografia da égua após o serviço é uma técnica útil para o diagnóstico de urospermia em criações de égua com serviço natural. Normalmente, elas têm um acúmulo hiperecoico de sedimento de cristal de urina no corpo do útero, o que, embora parecido com o aparecimento de ar, não possui a típica refração do ar (McKINNON, 2013) (Figura 6).



Figura 6. Sedimento de cristal de urina no corpo do útero da égua (McKINNON, 2013).

2.8 PROCESSAMENTO DE SÊMEN UROSPÉRMICO

2.8.1 Centrifugação "cushioned" de sêmen urospérmico equino

A centrifugação parece ser mais eficaz quando realizada no dia da coleta, mas também pode ser usada para alguns ejaculados armazenados até 24 h e há uma melhora na morfologia nas preparações de sêmen centrifugadas. A centrifugação melhora a qualidade das preparações de sêmen e as proporções de espermatozoides móveis e de espermatozoides com morfologia normal e cromatina intacta aumentam nas preparações de sêmen após centrifugação (MORREL et al., 2009).

A centrifugação em uma única camada (SLC) tem várias vantagens em relação à centrifugação com gradiente de densidade (DGC). O tempo de preparação é menor e o processo é menos complicado do que para o gradiente de densidade.. O uso de SLC facilita a expansão dos volumes de colóides e ejaculados utilizados, para processar um grande número de espermatozoides necessários para doses de inseminação em algumas espécies animais (MORREL et al., 2009).

A centrifugação do sêmen de garanhão é comumente usada em programas de melhoramento para aumentar a concentração do sêmen, maximizar a longevidade e a qualidade do sêmen e reduzir a concentração do plasma seminal e o volume inseminado (VARNER et al., 2008). A centrifugação sem "cushion" (amortecedor, "cushion") e ressuspensão no diluidor não melhora a motilidade em comparação com a diluição simples (GRIGGERS et al., 2001). A centrifugação "cushioned" (CC) foi utilizada para permitir uma maior velocidade de centrifugação e uma maior taxa de recuperação de sêmen, sem danos simultâneos no sêmen (BLISS et al., 2012).

A centrifugação "cushioned" (CC) usa iodixanol, um composto líquido iodado não iônico, que é colocado sob o sêmen para proteger o sêmen contra danos concêntricos durante o processo de centrifugação. Quando este procedimento é utilizado, os sólidos urinários (fração insolúvel) passam pelo "cushion" para atingir o fundo do tubo de centrífuga e são assim facilmente separados da amostra urospérmica. Os componentes solúveis da urina são retidos principalmente no sobrenadante (VOGE et al., 2016).

Para tratamentos CC, uma solução de "cushion" está em camadas abaixo do sêmen diluído (WAITE et al., 2008) e as amostras são centrifugadas a 1000 x g por 20 minutos (BLISS et al., 2012). Após a centrifugação, o sobrenadante (contendo a maior parte da fração de urina solúvel) e o fluido de "cushion" (contendo a fração de urina insolúvel) são aspirados e descartados. O sedimento de sêmen remanescente é transferido para um tubo cônico de 15 mL, depois é repostado novamente em um diluidor bruto para obter uma concentração final de sêmen de 30×10^6 / mL. As amostras de CC re-suspensas são posteriormente colocadas em tubos de encaixe instantâneo de 1,5 mL para análise posterior (VOGE et al., 2016).

2.8.2 Centrifugação com gradiente de densidade de sêmen equino

Preparação de sêmen pelo procedimento simplificado de camada única ou por centrifugação com gradiente de densidade oferecem um método eficaz para prolongar a sobrevivência de espermatozoides de garanhão para inseminação. O método de camada única é prático para a preparação de espermatozoides e não reduz o rendimento de espermatozoides móveis em grande medida em comparação com a centrifugação com gradiente de densidade (MORREL et al., 2009).

A centrifugação com gradiente de densidade foi sugerida como meio de seleção de espermatozoides animais para reprodução artificial (MORREL et al., 2009). Os gradientes de densidade de células espermáticas com diferentes gravidades específicas são separados em diferentes camadas. O primeiro gradiente de densidade descontínua continha solução de partículas de sílica revestida com silano e polivinilpirrolidona (Percoll®), mas já não está disponível para uso comercial. Outro produto de gradiente de densidade descontínua, PureSperm®, também emprega solução de partículas de sílica revestida com silano para separação de sêmen (MORTIMER, 2000; CHEN, BONGSO, 1999). Um produto denominado EquiPure™ está disponível para uso com sêmen equino (MACPHERSON et al., 2002) (Figura 8).

É necessário um cuidado no processamento das camadas, pois a mistura das diferentes densidades destrói a integridade da interface entre as duas camadas, reduzindo assim a eficiência da seleção de sêmen (MORREL et al., 2009).

A centrifugação com gradiente de densidade tem sido utilizada para selecionar populações de sêmen de qualidade superior (MORTIMER, 2000). A centrifugação com gradiente

de densidade é uma técnica amplamente utilizada, não só para separar as células espermáticas móveis dos espermatozoides sem motilidade, mas também para a remoção de agentes contaminantes, obtendo uma suspensão final de sêmen sem plasma seminal, leucócitos, contaminação microbiana e outros resíduos (ORTEGA-FERRUSOLA et al. 2009).



Figura 7. EquiPure™ 100 mL, suspensão coloidal para sêmen equino. (Foto: Arquivo pessoal)

Essa técnica de centrifugação foi testada em 6 ejaculados não urospermicos de 5 cavalos de raça leve e submetidos a tratamentos de gradiente de densidade de acordo com o gradiente de centrifugação do fabricante (Gradiente A: EquiPure™ 100, NidaCon International AB, pH 7,3; Gradiente B: EquiPure™ 100, NidaCon International AB, pH 7,6) (MACPHERSON et al., 2002) (Tabela 8).

A média de gradiente não teve efeito sobre os resultados finais da motilidade, no entanto, o Gradiente A produziu uma maior alteração na porcentagem de sêmen morfológico normal do que o Gradiente B. Além disso, o Gradiente A produziu uma menor alteração na porcentagem de caudas dobradas do que o Gradiente B. Nenhum efeito foi detectado nos resultados finais da velocidade do sêmen (MACPHERSON et al., 2002).

Este estudo demonstrou que o uso de um gradiente de densidade patenteado de partículas de sílica silanizadas (EquiPure™) pode melhorar a qualidade do sêmen em garanhões, conforme determinado por medidas de motilidade e morfologia espermáticas. Vários tipos de defeitos morfológicos do sêmen foram separados diferencialmente ao longo do gradiente descontínuo, produzindo uma porcentagem maior de sêmen morfológico normal no sedimento. As células germinativas prematuras, as cabeças destacadas e as gotículas proximais foram presas com mais

frequência no gradiente de 40%, enquanto que as cabeças de forma anormal, os grilhões de forma anormal, as caudas dobradas e as caudas enroladas foram presas em frequências semelhantes nos gradientes de 40 e 80% (MACPHERSON et al., 2002).

Table 8. Grupos de tratamento atribuídos por gradiente de densidade (MACPHERSON et al., 2002).

Tratamento	Diluyente	Gradiente de densidade (80:40)	Meio de lavagem	Meio de re-suspensão
1	Tampão A ^a	Gradiente A ^d	Wash A ^f	Wash A
2	Tampão A	Gradiente A	Wash A	CST
3	CST ^b	Gradiente A	Wash A	Wash A
4	CST	Gradiente A	Wash A	CST
5	Tampão B ^c	Gradiente B ^e	Wash B ^g	Wash B
6	Tampão B	Gradiente B	Wash B	CST
7	CST	Gradiente B	Wash B	Wash B
8	CST	Gradiente B	Wash B	CST

a Tampão A: Proprietário do meio (Stallion TALP, NidaCon International AB, Go terborg, Sweden) ajustado no pH 6.9

b CST: diluidor EZ-Mixin CSTTM (Animal Reproduction Systems).

c Tampão B: Proprietário do meio (Stallion TALP, NidaCon International AB) ajustado no pH 7.2

d Gradiente A: Proprietário do meio (EquiPureTM 100, NidaCon International AB; pH 7.3) ajustado para concentração de 40 e 80% com tampão A

e Gradiente B: Proprietário do meio (EquiPureTM 100, NidaCon International AB; pH 7.6) ajustado para concentração de 40 e 80% com tampão B

f Wash A: Tampão A contendo albumina de soro bovino (Fração V; 5 mg/mL)

g Wash B: Tampão B contendo albumina de soro bovino (Fração V; 5 mg/mL)

Outro trabalho obteve uma preparação de sêmen sem vírus da arterite equina após centrifugação com gradiente de densidade de ejaculados de garanhões que eliminavam o vírus no sêmen (MORREL, GERAGHTY, 2006).

3. CAPÍTULO I

Efeitos da contaminação urinária sobre a capacidade de criopreservação do sêmen de garanhões

RESUMO. A urospermia é um problema comum que afeta os garanhões reprodutores. Ao contaminar artificialmente o sêmen de 8 garanhões com urina, objetivamos avaliar através da motilidade e função espermática se o sêmen que apresenta contaminação moderada da urina pode ser congelado. Foram utilizados 8 garanhões de várias raças. Cada garanhão foi coletado 5 vezes, totalizando 40 ejaculados. As coletas de sêmen foram realizadas com o uso de vagina artificial. O sêmen foi alocado em frascos cônicos de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de sêmen bruto ao frasco "controle", 8 mL de sêmen bruto ao frasco de "baixa contaminação" e 5 mL de sêmen bruto ao frasco de "alta contaminação". Foram adicionados 2 mL de urina a cada frasco de "baixa contaminação", e 5 mL de urina foram adicionados a cada frasco de "alta contaminação". Uma vez que o sêmen foi exposto à urina por 2 minutos, cada um dos frascos foi diluído para 40 mL com um diluidor de sêmen. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de "cushion" no fundo de cada frasco cônico. Todos os tubos foram então centrifugados. Após a centrifugação, o sobrenadante e a solução de "cushion" foram aspirados e descartados. O sedimento de sêmen remanescente foi ressuspenso para uma concentração final de 200 milhões de espermatozoides / mL. O sêmen foi armazenado manualmente em palhetas de 0,5 mL em nitrogênio líquido. As amostras foram avaliadas para motilidade total e progressiva por meio da análise de sêmen assistida por computador (CASA) e da viabilidade espermática, potencial de membrana mitocondrial, integridade do acrossoma e estabilidade da cromatina espermática. Houve uma redução significativa na motilidade total e progressiva do sêmen com o aumento da contaminação da urina pré-congelamento. As motilidades pós-descongelamento não foram significativamente diferentes entre os grupos controle e com baixa contaminação por urina, mas foram significativamente maiores do que o grupo com alta contaminação por urina, e inferior aos parâmetros pré-congelados. Embora os níveis baixos de contaminação da urina tenham efeitos mínimos sobre os parâmetros do sêmen após a criopreservação, ejaculados com altos níveis (50%) de contaminação com urina, mostraram diminuição marcada na motilidade pós-descongelamento e viabilidade após a criopreservação, portanto, não deve ser utilizado para o congelamento de sêmen.

Palavras-chave: Urospermia, espermatozoide, criopreservação, viabilidade

1. Introdução

A urospermia é uma das disfunções ejaculatórias mais comuns em garanhões¹. A ocorrência de urospermia é imprevisível e pode ser um evento raro, isolado, um problema intermitente ou contínuo²⁻⁴. Infelizmente, a urospermia é um problema para alguns garanhões ao longo de toda a sua vida reprodutiva, o que faz com que o manejo de reprodução para a fertilidade ideal seja um verdadeiro desafio na prática clínica^{3,5}. Os efeitos prejudiciais da urina no sêmen parecem ser mediados pelo pH alcalino e alta osmolalidade da urina, bem como pela possível formação de cristais^{2,5,6}. Também pensa-se que a urina interfere com a fertilidade induzindo a inflamação do endométrio nas éguas inseminadas com sêmen contaminado⁵. O uso de diluidores parece tornar mais brandos os efeitos da urina no sêmen⁶ e os efeitos da urospermia são diminuídos em éguas artificialmente inseminadas com sêmen contaminado com urina que tenha sido diluído anteriormente.

A urospermia tem sido associada a uma ampla gama de condições, como lesões que interferem nas vias neurológicas lombossacrais normais, ao vírus herpes 1, toxicose do sorgo, cistite, paralisia periódica hipercalêmica ou causas idiopáticas^{5,7,8}. Em geral, as causas idiopáticas parecem ser mais prevalentes, o que desafia nossa capacidade de tratar ou gerenciar a condição^{8,9}. Prática de manejo comum para garanhões com urospermia recorrente, incluem o encorajamento de garanhões para urinar antes da coleta ou reprodução, cateterismo da bexiga antes da coleta, coleta de sêmen fracionada e intervenção farmacológica com drogas como o cloridrato de imipramina para melhorar o controle do esfíncter da bexiga^{2-4,10-12}. Apesar dessas práticas, a urospermia ainda é problemática para alguns garanhões, mesmo após tentativas repetidas de obter amostras de sêmen sem urina^{2,5,8}.

O Azostix® (Bayer Animal Health, Shawnee, Kansas), uma tira de teste disponível comercialmente para medir o nitrogênio da uréia no sangue, é útil para diagnosticar a contaminação da urina no sêmen bruto de garanhão¹³. Um segundo estudo demonstrou que o pH alcalino e a alta osmolalidade da urina são prejudiciais à motilidade do sêmen⁶. Recentemente, Ellerbrock e colaboradores demonstraram os efeitos prejudiciais da urospermia e do pH elevado na motilidade espermática no sêmen armazenado refrigerado¹⁴. Este estudo foi seguido por um estudo de Voge e colaboradores, que mostraram que a centrifugação pode diminuir os efeitos de baixos graus de contaminação urinária após o resfriamento e armazenamento do sêmen²⁸.

Embora se saiba que a urina possa ter um efeito prejudicial sobre a qualidade do sêmen e sobre a fertilidade do garanhão, os efeitos da urina sobre o sêmen durante a criopreservação são desconhecidos. Devido aos efeitos da centrifugação na urina contaminante, postulamos que o sêmen com baixa contaminação de urina (20% de urina) possa ser criopreservado com sucesso apenas com mudanças marginais na qualidade do espermatozoide em comparação com as amostras de controle, enquanto o sêmen com grande proporção de contaminação com urina (50% urina) teria muito baixa motilidade espermática, integridade da membrana espermática e a estrutura do acrossoma e do DNA.

O objetivo foi avaliar através da motilidade e função espermática (integridade de membrana, do acrossoma e potencial mitocondrial) se o sêmen que apresenta contaminação moderada da urina possa manter motilidade e função aceitáveis depois de criopreservado.

2. Material e métodos

Foram utilizados no estudo oito garanhões de várias raças (Quarto de Milha, Paint Horse, Puro Sangue Inglês), saudáveis e em idade reprodutiva, alojados em baias na Clínica de Grandes Animais da Universidade do Illinois e alimentados com dietas semelhantes de capim / alfafa. As amostras de urina foram coletadas 1 semana antes do experimento de três dos garanhões envolvidos no estudo. A urina dos três garanhões foi combinada, dividida em alíquotas de 100 mL e depois congelada a -20° C até o uso posterior. Todos os garanhões tinham histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto a saúde geral, a integridade dos órgãos reprodutivos e a qualidade espermática. Os garanhões foram então coletados a cada 2 a 3 dias com um modelo Missouri de vagina artificial até a obtenção de 5 ejaculados, totalizando 40 ejaculados. O Comitê Institucional de Uso e Cuidados Animais (Animal Care and Use Committee), sob o protocolo nº 14200, aprovou todos os procedimentos realizados no presente estudo.

A porção livre de gel de cada ejaculado foi pesada para mensuração do volume seminal e realizada uma avaliação visual da presença de contaminantes. O pH do sêmen medido usando um medidor de pH manual (a) disponível no mercado. O pH do sêmen aceitável foi considerado inferior a 7,7^{6,14}. Uma pequena alíquota de sêmen bruto foi congelada em tubos criovacs para medição de ureia e creatinina usando um analisador automatizado quantitativo (b). Os valores normais aceitáveis para ureia e creatinina no sêmen garanhão são $<30\text{mg} / \text{dL}$ e $<2 \text{mg} / \text{dL}$,

respectivamente⁵. As amostras de sêmen com alta concentração de ureia e creatinina ou pH alcalino (> 8) foram diagnosticadas com urospermia^{2,12,27} e descartadas.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade e vigor, e somente os ejaculados que apresentavam valores dentro da normalidade foram utilizados no experimento. A concentração do sêmen foi determinada usando-se um espectrofotômetro (c) de acordo com as instruções do fabricante. O sêmen foi então alocado em tubos cônicos de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de sêmen bruto ao tubo de controle (CON), 8 mL de sêmen bruto ao tubo 2 de "baixa contaminação" (BAIXA) e 5 mL de sêmen bruto ao tubo de "alta contaminação" (ALTA). Foram adicionados dois mL de urina a cada tubo BAIXA, e cinco mL de urina foram adicionados a cada tubo ALTA. Uma vez que o sêmen foi exposto à urina durante 2 minutos, cada um dos tubos foi diluído para 40 mL com um diluidor de sêmen à base de leite (d).

Após a extensão, adicionou-se 1 mL da solução de "cushion" de sêmen (e) no fundo de cada tubo cônico com o uso de uma agulha de coluna longa (18G 3,5")²⁹. Todos os tubos foram então centrifugados à temperatura ambiente a 1000 g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante e a solução de "cushion" foram aspirados e descartados. O sedimento de sêmen remanescente foi ressuspensão com um diluidor de congelamento comercialmente disponível (f) para uma concentração final de 200 milhões de espermatozoides / mL. O sêmen foi então envasado manualmente em palhetas de 0,5 mL e depois resfriado a 5 ° C durante 20 minutos. Para congelamento, o sêmen foi então colocado sob uma grade a 4 cm acima do nitrogênio líquido durante 15 minutos antes de ser imerso em nitrogênio líquido. As amostras criopreservadas foram armazenadas em botijão de nitrogênio até análises posteriores.

2.1 Análise da motilidade espermática

Imediatamente antes do congelamento do sêmen e após o descongelamento, uma amostra de cada ejaculado foi diluída com um diluidor à base de leite para 20 milhões de espermatozoides / mL. A amostra foi avaliada para motilidade total e progressiva por meio da análise de sêmen assistida por computador (CASA) (g) usando-se as configurações padrão para o sêmen de equino conforme recomendado pelo fabricante. Além disso, foram avaliados outros parâmetros anteriormente relacionados à motilidade e função normais (velocidade curvilínea (VCL), progressão angular (VAP), velocidade linear (VSL), retidão (STR), amplitude da cabeça lateral (ALH) e linearidade (LIN)¹⁷.

2.2 Citometria de fluxo

O sêmen de garanhão previamente criopreservado (200 milhões de espermatozoides por mililitro) foi descongelado a 37° C durante 1 minuto para análise e os três protocolos de coloração seguintes foram implementados (viabilidade espermática e potencial de membrana mitocondrial; integridade do acrossoma; estabilidade da cromatina espermática). As amostras foram analisadas usando um analisador de citometria de fluxo BD LSR II (h) no Centro de Biotecnologia da Universidade do Illinois.

2.2.1 Integridade da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial

As associações das sondas fluorescentes de SYBR-14 (i) (0,02 mM em DMSO), Iodeto de Propídeo - PI (j) (2,4 mM em água) e JC-1 (3 mM em DMSO) foram preparadas como descrito anteriormente na literatura¹⁶. As concentrações finais das sondas foram 100 nM de SYBR-14, 12 µM PI e 3 µM de JC-1. Foram adicionados 5 µL de sêmen descongelado a 0,5 mL de solução de coloração para criar uma concentração final de 2 milhões de espermatozoides por mililitro. A amostra foi misturada por pipetagem reversa e incubada a 37° C durante 30 minutos.

Os três corantes foram excitados usando um laser de excitação de argônio de 488 nm. Um total de 20.000 espermatozoides foram analisados a uma taxa de fluxo de 200 células / s. Os debris foram descartados com base nos espermatozoides que emitiram uma mínima fluorescência vermelha e verde. Foram esperadas quatro populações de espermatozoides nas preparações de sêmen coradas com SYBR-14 / PI / JC-1^{17,18}. As células presuntivamente viáveis compõem as populações 1 e 3, com sinal fluorescente verde (SYBR-14 positivo) detectado na cabeça e / peça intermediária usando detector de fluorescência 1 (detecta fótons emitidos no comprimento de onda de 515-545 nm). A população 1 inclui células espermáticas viáveis com peças intermediárias que se coram fracamente de laranja devido à formação de monômeros. A população 3 inclui células de espermatozoides viáveis com peças intermediárias coradas de laranja devido à formação de agregados JC em alto potencial de membrana mitocondrial (hMMP). A população 2 perde a cor laranja na parte intermediária, adquirindo tonalidade verde

fraca (monômero), então a quantidade de verde nesse sêmen é menor que as populações 1 e 3 que são verdes devido a SYBR. A população 2 é laranja / vermelho devido a PI na cabeça e verde devido à parte intermediária. A população 4 inclui aqueles espermatozoides que não estão intimamente associados com a população 1, 2 ou 3. A média e o SD da fluorescência do canal verde e vermelho foram medidos para cada população.

2.2.2 Integridade do acrossoma

As sondas fluorescentes de FITC-PNA (k) (1 mg / mL em PBS) foram preparadas como descrito anteriormente na literatura¹⁶. As concentrações finais das sondas foram 1,5 μ M PI e 1 μ g / mL de FITC-PNA. Foram adicionados 5 μ L de sêmen de garanhão descongelado a 0,5 mL de solução de coloração para uma concentração final de 2 milhões de espermatozoides / mL. A amostra foi misturada por pipetagem reversa e incubada a 37° C durante 10 a 15 minutos. A fluorescência FITC-PNA foi detectada no detector de fluorescência 515-545 nm. Os espermatozoides não espermáticos foram excluídos das análises, conforme avaliado nas propriedades de dispersão. Foram registrados 20 mil espermatozoides fechados e desenhadas tramas bidimensionais de espermatozoides de fluorescência FITC-PNA versus PI. As subpopulações foram subdivididas por quadrantes e a frequência de cada subpopulação quantificada.

2.2.3 Estabilidade da cromatina espermática

A estabilidade da cromatina foi avaliada por coloração metacromática com laranja de acridina (AO) com base na susceptibilidade do DNA do sêmen a desnaturação induzida por ácido in situ como descrito anteriormente na literatura¹⁵. Este é um corante de ligação de ácido nucléico permeável às células que emite fluorescência verde quando ligado a dsDNA e fluorescência vermelha quando ligado a ssDNA ou RNA. Foram adicionados 10 μ L de sêmen descongelado a 990 μ L de PBS para criar uma concentração final de sêmen de 2 milhões de espermatozoides por mililitro. A desnaturação induzida por ácido in situ do DNA foi obtida pela adição de 0,4 mL de uma solução detergente de ácido (0,1% Triton X-100, NaCl 0,15 M e HCl 0,08 N, pH 1,4) a 0,2 mL de sêmen diluído. Após 30 segundos, as células foram coradas adicionando-se 1,2 mL de uma solução (0,1 M de ácido cítrico, 0,2 M de Na₂HPO₄, 1 mM de

EDTA, NaCl 0,15 M, pH 6,0) contendo 6 ug / mL de AO (l). As amostras coradas foram analisadas 3 minutos após a coloração com AO. A análise de citometria de fluxo foi realizada como acima. Os dados correspondentes à fluorescência vermelha e verde das partículas adquiridas foram registrados (os resíduos foram descartados eletronicamente).

3. Análise estatística

Os dados são apresentados como médias \pm SEM. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o programa R para computação estatística versão 3.2.2 (www.r-project.org/). O software é livre para computação estatística e gráficos. Os dados de motilidade e citometria de fluxo foram analisados por medidas repetidas de ANOVA. Os testes Tukey HSD foram realizados conforme necessário para análise pós-hoc.

4. Resultados

O pH das amostras aumentou significativamente com o aumento da contaminação urinária. Houve uma redução significativa nas motilidades total e progressiva do sêmen com o aumento da contaminação por urina para todos os grupos no pré-congelamento. As motilidades total e progressiva no pós-descongelamento dos grupos controle e com baixa contaminação por urina não foram significativamente diferentes entre si, mas foram significativamente maiores do que o grupo com alta contaminação por urina. Ainda observou-se que as motilidades pós-descongelamento foram inferiores aos parâmetros pré-congelados ($p < 0,05$) (tabela 1).

Houve uma redução significativa nos resultados para VCL, VAP e VSL nos grupos com alta contaminação por urina tanto no pré-congelamento quanto no pós-descongelamento. Nenhuma diferença foi observada nos resultados para LIN e STR entre qualquer grupo ($p < 0,05$) (tabela 2).

A viabilidade do sêmen pós-descongelamento foi significativamente menor no grupo com alta contaminação por urina ($54,7 \pm 2,4$) do que nos grupos controle ($63,8 \pm 2,3$) ou com baixa contaminação por urina ($64,6 \pm 3,4$). Não foram observadas diferenças na integridade do acrossoma ou na estabilidade da cromatina espermática entre os grupos (tabela 3).

Tabela 1: Motilidades das amostras de sêmen submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação por urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 40 ejaculados), pré-congelamento e pós-descongelamento.

Tratamento	pH	Pré-congelamento		Pós-descongelamento	
		Motilidade total	Motilidade progressiva	Motilidade total	Motilidade progressiva
Controle	7.54 ± 0.04 ^a	67.0 ± 1.7 ^a	49.8 ± 2.2 ^a	53.9 ± 2.3 ^a	40.8 ± 3.3 ^a
Baixa	8.3 ± 0.03 ^b	60.3 ± 1.7 ^b	42.5 ± 2.1 ^b	51.7 ± 1.8 ^a	36.2 ± 2.1 ^a
Alta	8.6 ± 0.02 ^c	41.3 ± 2.0 ^c	21.3 ± 1.5 ^c	31.49 ± 1.2 ^b	17.1 ± 1.0 ^b

Letras diferentes dentro das colunas demonstram diferenças estatísticas (p<0.05).

Tabela 2: Velocidades das amostras de sêmen submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação por urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 40 ejaculados), pré-congelamento e pós-descongelamento.

Tratamento	VCL ¹ (µm/sec)	VAP ² (µm/sec)	VSL ³ (µm/sec)	LIN ⁴ (%)	STR ⁵ (%)
Pré-congelamento					
Controle	138.1±30.6 ^a	71.9±14.2 ^a	56.9±10.1 ^a	0.42±0.08	0.77±0.05
Baixa	134.5±36.5 ^a	71.2±17.0 ^a	55.7±13.1 ^a	0.43±0.07	0.76±0.06
Alta	94.5±38.4 ^b	46.7±25.1 ^b	30.2±17.1 ^b	0.41±0.06	0.75±0.05
Pós-descongelamento					
Controle	136.3±30.4 ^a	69.8±14.3 ^a	55.6±10.4 ^a	0.40±0.07	0.72±0.08
Baixa	132.7±36.3 ^a	68.1±17.1 ^a	54.8±13.0 ^a	0.39±0.08	0.72±0.07
Alta	91±32.5 ^b	45.5±25.0 ^b	30.4±17.0 ^b	0.38±0.07	0.71±0.06

Letras diferentes dentro das colunas demonstram diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

¹VCL – Velocidade curvilínea

²VAP – Velocidade média do trajeto

³VSL – Velocidade linear

⁴LIN - Linearidade

⁵STR - Retilinearidade

Tabela 3: Avaliação da viabilidade e potencial mitocondrial (SYBR-14 / PI / JC-1), integridade do acrossoma (FITC-PNA) e integridade da cromatina (AO) de sêmen de garanhão criopreservado após nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação por urina (baixa) ou 50% de contaminação por urina (alta) (n = 40 ejaculados).

Parâmetro	Controle	Baixa	Alta
DNA espermático intacto (%)	81.6 ± 3.0	79.2 ± 3.4	71.3 ± 5.7
DNA espermático danificado (%)	18.4 ± 3.0	20.8 ± 3.4	28.7 ± 5.7
Morto, acrossoma intacto	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2
Morto, acrossoma danificado	32.8 ± 0.9	35.1 ± 1.9	45.3 ± 2.6
Vivo, acrossoma intacto	23.4 ± 4.4	22.5 ± 3.5	21.3 ± 2.8
Vivo, acrossoma danificado	42.8 ± 4.9	41.2 ± 3.2	32.0 ± 2.4
Vivo, mitocôndria polarizada	7.8 ± 1.1 ^a	7.4 ± 1.2 ^a	8.5 ± 1.2 ^b
Vivo, mitocôndria despolarizada	56.0 ± 2.3 ^a	57.2 ± 3.4 ^a	46.2 ± 3.6 ^b
Morto (deformação tripla)	36.2 ± 2.2	35.5 ± 3.3	45.2 ± 3.6

Letras diferentes dentro das linhas demonstram diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

5. Discussão

O sêmen foi exposto à urina neste estudo de forma semelhante ao estudo realizado por Ellerbrock e colaboradores¹⁴. Esse período de exposição à urina explica o tempo estimado necessário para o processamento de sêmen de rotina, de modo que, se o ejaculado for

espontaneamente contaminado com urina, o sêmen ficará diretamente exposto à urina por uma média de 3 minutos antes da adição do diluidor de sêmen. Misturando a urina, o sêmen e o diluidor em conjunto, conforme feito por Voge e colaboradores²⁸, pode-se simular de maneira realista uma coleta de um ganhão urospérmico conhecido, mas não explica os danos ao sêmen em coletas onde a urospermia não era esperada.

Nesse estudo, o pH das amostras contaminadas com urina foi maior do que o pH das amostras controle. Resultados semelhantes foram obtidos em estudo anterior, onde o pH do grupo com uma grande quantidade de contaminação urinária foi significativamente maior do que o grupo controle. Ainda segundo esses mesmos autores, embora esta seja uma descoberta interessante, seu uso na prática clínica pode ser difícil, pois houve uma pequena tendência entre as amostras¹⁴.

Como esperado, a contaminação por urina afeta a motilidade inicial do sêmen e também a motilidade após o resfriamento durante 24 horas, mesmo quando uma pequena quantidade de urina está presente¹⁴. A adição de grandes volumes de urina obtida após o uso de diuréticos e de urina coletada por cateterização resultaram em aumento da osmolaridade e pH e diminuição significativa da motilidade imediatamente após o tratamento ($P < 0,05$). O efeito da adição de 33 ou 50% de urina cateterizada resultou em uma redução imediata para 5% e 0% de motilidade progressiva, respectivamente⁶.

A contaminação por urina pode ser um problema significativo e frustrante para o manejo de alguns ganhões. Enquanto alguns ganhões têm causas musculoesqueléticas ou neurológicas para a urospermia, as causas idiopáticas são mais comuns e dificultam o tratamento. A maioria dos casos é gerida por múltiplas modalidades, visando o melhoramento do sêmen no momento da coleta. Estudos anteriores demonstraram que a extensão imediata com um diluidor baseado em leite não previne completamente os efeitos prejudiciais da urospermia^{10,14,28}, mas ajuda a limitar tais efeitos, talvez corrigindo os efeitos prejudiciais de uma solução hipertônica e do pH alcalino¹⁴. O diluidor a base de leite desnatado é rico em lipoproteínas e tem a capacidade de estabilizar elementos proteicos da membrana do espermatozoide³⁰.

Quando um diluidor de gema de ovo foi adicionado ao sêmen contaminado com urina em proporção de 1: 1 ou 1: 3 (sêmen: diluidor), não houve melhora significativa da motilidade sobre o sêmen contaminado com urina. No entanto, a adição do diluidor de leite desnatado resultou em um aumento na motilidade imediatamente após o tratamento. Após 1 h, o sêmen contaminado com urina tratado com um diluidor apresentava sêmen mais progressivamente móvel do que o

sêmen contaminado sem diluidor, mas não era diferente do sêmen sem urina. O diluidor de leite desnatado restaurou a motilidade melhor do que o diluidor de gema de ovo com uma proporção 1: 3 imediatamente após a adição e em qualquer proporção quando centrifugada. Além disso, o diluidor de leite desnatado continuou a fornecer motilidade superior em comparação com o diluidor de gema de ovo nessas circunstâncias 1 h após centrifugação e ressuspensão⁶.

Embora se possa esperar que a centrifugação ofereça um benefício adicional reduzindo a quantidade de urina que contamina o sêmen, a centrifugação do ejaculado e a ressuspensão com diluidor fresco não apresentaram nenhuma vantagem em relação à simples adição de diluidor⁶. É possível que a exposição dos espermatozóides a uma maior concentração de cristais de urina, que seria centrifugada no sedimento junto com os espermatozóides, poderia causar danos adicionais às células e negar qualquer efeito benéfico da centrifugação. Além disso, uma potencial desvantagem da centrifugação é a possível perda de alguns espermatozóides viáveis no sobrenadante descartado se o procedimento não for realizado corretamente, por exemplo, com a remoção imediata do sobrenadante após a cessação do processo de centrifugação. Enquanto a centrifugação é uma técnica valiosa para remover o plasma seminal indesejado para alguns ganhos inférteis, dados anteriores não suportam seu uso em casos de urospermia⁶. Amostras com maiores proporções de diluidor para sêmen pareciam fornecer melhor motilidade inicial do que as amostras com menores proporções.

O estudo atual abordou se os ejaculados contaminados com urina podem ser criopreservados após a centrifugação com "cushion" de forma padrão. Os resultados do CASA, demonstraram que as motilidades total e progressiva do sêmen pré-congelado diminuíram significativamente com o aumento da dose de urina. Embora as motilidades do sêmen pré-congelado terem sido significativamente diferentes entre os grupos de tratamento, não foram observadas diferenças na motilidade entre os grupos de controle e de baixa contaminação por urina nas motilidades pós-descongelamento, sugerindo que o processo de centrifugação com "cushion" e congelamento eliminou os efeitos de pequenas quantidades de urina nos parâmetros do sêmen.

A viabilidade das amostras pós-descongeladas de sêmen com alta contaminação urinária foram menores que nos demais grupos, mas não foram observadas diferenças na qualidade do DNA do sêmen com o aumento da contaminação da urina. Isso é contrário ao esperado com base em outros estudos de urospermia²⁸. Da mesma forma, não foram observadas diferenças na integridade do acrossoma com o aumento da contaminação da urina.

6. Conclusão

O sêmen contaminado com uma pequena quantidade de urina pode ser utilizado para a criopreservação, enquanto que o altamente contaminado com urina não pode ser utilizado. Uma limitação do presente estudo é que não pré-formamos um teste de fertilidade, no entanto, agora que uma clara diferença foi demonstrada nos parâmetros pós-descongelamento, isso pode ser realizado no futuro. Vários ganhões e proprietários de cavalos se beneficiarão diretamente dos resultados do presente estudo, pois esse fornece sugestões sobre como gerenciar amostras urospérmicas e parâmetros potenciais para decidir quando um ejaculado é viável para a criopreservação.

Notas de rodapé

- (a) LAQUA Twin, Horiba Inc., Irvine, CA, 92618
- (b) Beckman Coulter, Pasadena, CA 92821
- (c) Equine Densimeter II, ARS, Chino, CA 917
- (d) Equi-Pro[®] Cool Guard[®], MOFA Global, Vernon, WI 53593
- (e) Maxifreeze[®], IMV, Maple Grove, MN 55369
- (f) BotuCrio, Biotech Botucatu, Botucatu, Sao Paulo, Brazil
- (g) Spermvision II[®], MOFA Global, Verona, WI, 53593
- (h) BD Biosciences, San Jose, CA, 95131
- (i) Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)
- (j) Sigma Chemical Co., St. Louis, MI
- (k) Sigma Chemical Co., St. Louis, MI
- (l) Polysciences, Inc., Warrington, PA

Agradecimento

A Fundação Americana do Cavalo Quarto de Milha pelo suporte financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí.

Declaração de Ética

Os autores afirmam ter aderido aos Princípios da Ética Médica Veterinária da Associação Americana de Medicina Veterinária.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- [1] McDonnell SM. Ejaculation physiology and dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1992; 8:57-70.
- [2] Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL et al. Diseases affecting semen. In: Varner DD, Schumacher J, Blanchard TL, Johnson L, editors. Diseases and management of breeding stallions. 1st ed. Goleta CA: American Veterinary Publications; 1991.
- [3] Turner RO, Love C, McDonnell S et al. Use of imipramine hydrochloride for treatment of urospermia in a stallion with a dysfunctional bladder. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1995; 207:1602-6.
- [4] Lowe J. Diagnosis and management of urospermia in a commercial thoroughbred stallion. *Equine Veterinary Education* 2001; 13:4-7.
- [5] Dascanio JJ. Diagnosis and management of urospermia. In *Equine Reproductive Procedures*, First edition, JJ Dascanio, PM McCue. John Wiley & Sons, 2014.
- [6] Griggers S, Paccamonti DL, Thompson RA et al. The effects of pH, osmolality and urine contamination on equine spermatozoal motility. *Theriogenology* 2001; 56:613-22.
- [7] Naylor JM, Nickel DD, Trimino G et al. Hyperkalemic periodic paralysis in homozygous and heterozygous horses: A co-dominant genetic condition. *Equine Veterinary Education* 1999; 31:153-9.
- [8] Turner RMO. Urospermia and Hemospermia. In: McKinnon A, editor. *Current Therapy in Equine Reproduction*. Saint Louis: W.B. Saunders; 2007.
- [9] Voss J, McKinnon A. Hemospermia and urospermia. *Equine Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia 1993:864-70.

- [10] Nash JG-Jr, Voss JL, Squires EL. Urination during ejaculation in a stallion. *Journal of American Veterinary Medical Association* 1980; 176:224-7.
- [11] Hoyos SM, Quiroz, RG, Brumbaugh G et al. Lack of beneficial effects of bethanechol, imipramine or furosemide on seminal plasma of three stallions with urospermia. *Reproduction of Domestic Animals* 1999; 34:489-93.
- [12] Dascanio JJ, Witonsky SG. Theriogenology question of the month. Urospermia. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2005; 227: 225-7.
- [13] Althouse GC, Seager SWJ, Varner DD et al. Diagnostic aids for the detection of urine in the equine ejaculate. *Theriogenology* 1989; 31:1141-8.
- [14] Ellerbrock RE, Canisso IF, Lima FS et al. Diagnosis and effects of urine contamination on cooled stored stallion semen. *Theriogenology*. Accepted. 10-25-15.
- [15] Martínez-Pastor F, Johannisson A, Gil J et al. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* 2004; 84: 121-133.
- [16] Robles V, Martínez-Pastor F. Flow cytometric methods for sperm assessment. *Spermatogenesis. Humana Press* 2013; 175-186.
- [17] Love CC, Thompson JA, Brinkso SP et al. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 2003; 60:1127-1138.
- [18] Garner, DL, Thomas CA. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential in the mitochondrial function of bovine sperm. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53:222-229.
- [19] Gaczarzewicz D, Udala J, Pasecka M et al. Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability. *Turkish Journal of Biology* 2015; 39: 582-594.
- [20] Volpe S, Leoci R, Aiudi G, Lacalandra GM Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reproduction of Domestic Animals* 2009; 44: 275-278.
- [21] Cheng F-P, Fazeli A, Voorhout WF et al. Use of Peanut Agglutinin to Assess the Acrosomal Status and the Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Stallion Spermatozoa. *Journal of Andrology* 1996; 17: 674-682.

- [22] Love CC, Kenney RM. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology* 1998; 50:955-72.
- [23] Varghese AC, Fischer-Hammadeh C, Hammadeh ME. Acridine orange test for assessment of human sperm DNA integrity. *Chromatin*. Springer New York, 2011; 189-199.
- [24] Dobrinski I, Hughes HPA, Barth AD. Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *Journal of Reproduction and Fertility* 1994; 101: 531-538.
- [25] Evenson DPL, Thompson LJ. Flow cytonmetric evaluation of boar sêmen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology* 1994; 41: 637-651.
- [26] Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science* 2001; 65:75-88.
- [27] Ball BA. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A review. *Journal of Equine Veterinary Science* 2008; 28:650-65.
- [28] Voge J, Varner, D, Blanchard T et al. The effects of urine concentration and "cushion" centrifugation to remove urine, on the quality of cool-storage of stallion sperm. *Theriogenology*, 2016; 86:1294-1298
- [29] Waite JA, Love CC, Brinsko SP et al. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following "cushioned" centrifugation. *Theriogenology*, 2008 70(4), 704-714.
- [30] Watson, PF. The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981.

4. CAPÍTULO II

Centrifugação com gradiente de densidade e aumento da seleção de espermatozoides com morfologia normal em sêmen urospérmico de garanhões

RESUMO. Urospermia, uma condição em que o sêmen é contaminado com urina, afeta muitos garanhões de todas as raças. Os ejaculados urospérmicos podem ocorrer de forma esporádica ou consistente em garanhões e são uma importante condição do garanhão capaz de reduzir a fertilidade. Foram utilizados cinco garanhões de raça, saudáveis e em idade reprodutiva. As amostras de urina foram coletadas 1 semana antes do experimento de três dos garanhões envolvidos no estudo. A urina dos três garanhões foi misturada, dividida em alíquotas e depois congelada até o uso posterior. As amostras experimentais de sêmen foram coletadas a cada 2 a 3 dias, com os garanhões saltando sobre um manequim, com auxílio de uma égua no cio e vagina artificial até que cinco ejaculados fossem obtidos. O sêmen foi alocado em frascos cônicos de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de sêmen bruto ao frasco "controle", 8 mL de sêmen bruto ao frasco de "baixa contaminação" e 5 mL de sêmen bruto ao frasco de "alta contaminação". Foram adicionados 2 mL de urina a cada frasco de "baixa contaminação", e 5 mL de urina foram adicionados a cada frasco de "alta contaminação". Uma vez que o sêmen foi exposto à urina por 2 minutos, cada um dos frascos foi diluído para 40 mL com um diluidor de sêmen. Em seguida, adicionou-se 1 mL de solução de "cushion" no fundo de cada frasco cônico. Todos os tubos foram então centrifugados à temperatura ambiente a 1000 x g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante e a solução de "cushion" foram aspirados e descartados. As amostras foram novamente suspensas num diluidor à base de leite comercialmente disponível e depois centrifugadas através de 3 mL de EquiPure™ a 400 x g durante 20 minutos. Este estudo investigou se a centrifugação com gradiente de densidade pode melhorar o sêmen de garanhões por avaliação da motilidade e morfologia espermática, utilizando sêmen urospérmico criopreservado de garanhões. Os resultados demonstraram que a centrifugação com gradiente de densidade melhorou a motilidade, a viabilidade e aumentou a seleção de espermatozoides com morfologia normal dos ejaculados urospérmicos de garanhões.

Palavras-chave: Cavalo, gradiente de densidade, urina, morfologia

Introdução

A urospermia é a contaminação do sêmen com urina e uma condição importante do ganhão² e prejudicial para a motilidade do sêmen³, a integridade acrossômica da membrana e reduz a capacidade de fertilização espermática⁴. Os efeitos deletérios da urina nos espermatozoides são devidos a alterações no pH, osmolalidade e efeitos tóxicos da ureia^{5,6}.

A urospermia pode desenvolver-se como uma desordem isolada ou pode estar associada a anormalidades neurológicas primárias, como a neurite da cauda equina, a mieloencefalite de protozoários equina, o herpesvírus equino 1 e a toxicose do sorgo, bem como outras condições médicas tais como paralisia periódica hipercalêmica, cistite e urolitíase^{7,8}. Além disso, alguns casos não parecem estar associados a uma condição patológica ou médica específica e podem ser de origem comportamental⁷. A urospermia também pode se desenvolver secundariamente a fraturas, osteomielite e neoplasia^{1,8}. Os ganhões com menor desenvolvimento sacral podem ser impotentes devido a ereções incompletas e estéreis devido à urospermia⁹. A Urospermia é também mencionada como uma desordem ejaculatória causada pela falha no fechamento do colo da bexiga no momento da ejaculação¹⁰. O sêmen contaminado pela urina (dentro da bexiga urinária) também pode ocorrer durante a ejaculação retrógrada¹¹.

Pouca informação está disponível sobre a etiopatogenia e tratamento da urospermia⁸, mas provavelmente resulta de um distúrbio funcional do complexo mecanismo nervoso que controla o processo ejaculatório¹².

A contaminação urinária do sêmen pode ser detectada em alguns ejaculados por uma mudança grosseira de cor ou odor¹³. Em outros casos, a urospermia pode ser mais difícil de detectar e requer o uso de ensaios de ureia ou creatinina¹³. O pH, a cor e o odor do sêmen não são testes confiáveis para a detecção de pequenas quantidades de contaminação urinária em amostras arrefecidas, mas uma tira de teste comercial de nitrogênio ureico pode detectar a presença de pequenas e/ou moderadas concentrações de urina em amostras arrefecidas e diluídas¹⁴.

Um ganhão com micção persistente durante a ejaculação não mostra outras anormalidades do sistema urogenital¹⁵. A libido do ganhão é boa. Ele desenvolve e mantém uma ereção e monta normais, mas não consegue se acasalar bem durante o salto¹⁶.

Estudos preliminares revelaram que a adição de urina em pequenas concentrações ao sêmen antes da adição de diluidor resultou em uma redução acentuada na motilidade

espermática². A contaminação por urina afeta a motilidade inicial e a motilidade do sêmen após o resfriamento durante 24 horas¹⁴.

Nos cavalos, a adição de diluidor de sêmen restaurou a motilidade do sêmen contaminado com urina; no entanto, os procedimentos de lavagem de sêmen requerem centrifugação para remover a urina, o que pode danificar os espermatozoides, provocando a reconcentração de cristais de urina no sedimento. A centrifugação do sêmen contaminado com urina e a ressuspensão com o diluidor não melhoram a motilidade acima, simplesmente adicionando diluidor⁵.

Durante a centrifugação "cushioned" (CC), os sólidos urinários (fração insolúvel) passam pelo "cushion" para atingir o fundo do tubo de centrífuga e, portanto, são facilmente separados da amostra urospérmica. Os componentes solúveis da urina são retidos principalmente no sobrenadante².

A centrifugação com gradiente de densidade tem sido utilizada para selecionar populações de sêmen de qualidade ainda superior¹⁷. A centrifugação por gradiente de densidade é uma técnica amplamente utilizada, não só para separar as células espermáticas móveis, mas também para a remoção de agentes contaminantes, obtendo uma suspensão final de sêmen sem plasma seminal, leucócitos, contaminação microbiana e outros resíduos¹⁸.

Embora se saiba que a urina pode ter um efeito prejudicial sobre a qualidade do sêmen e sobre a fertilidade do garanhão, os efeitos sobre a criopreservação são desconhecidos. Baseado nos efeitos da centrifugação de sêmen equino contaminado por urina, foi levantada a hipótese de que o sêmen com baixa contaminação urinária (20% de urina) e uma alta proporção de contaminação urinária (50% de urina) podem ser criopreservados com sucesso após a centrifugação com gradiente de densidade com apenas mudanças marginais na qualidade do sêmen comparadas com amostras controle, incluindo a melhora da motilidade do sêmen pós-congelamento, integridade da membrana espermática, estrutura de acrossoma e DNA, além de aumento da seleção de espermatozoides com morfologia normal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da centrifugação através de um gradiente de densidade na motilidade, bem como na seleção de espermatozoides com morfologia normal, de ejaculados de garanhões contaminados com urina.

Material e métodos

Foram utilizados cinco garanhões de raça saudáveis e em idade reprodutiva no estudo, alojados em baias na Clínica de Grandes Animais da Universidade de Illinois e alimentados com dietas semelhantes de capim / alfafa. As amostras de urina foram coletadas 1 semana antes do experimento de três dos garanhões envolvidos no estudo. A urina dos três garanhões foi misturada, dividida em alíquotas de 100 mL e depois congelada a -20° C até o uso posterior. Todos os garanhões tinham histórico de fertilidade comprovada e foram avaliados quanto a saúde geral, a integridade dos órgãos reprodutivos e a qualidade espermática. As amostras experimentais de sêmen foram então coletadas a cada 2 a 3 dias, com os garanhões saltando sobre um manequim, com o auxílio de uma égua no cio e com um modelo Missouri ou modelo Botucatu de vagina artificial (dependendo do que funcionasse melhor para cada animal) até que cinco ejaculados fossem obtidos. O Comitê Institucional de Uso e Cuidados Animais (Animal Care and Use Committee), sob o protocolo nº 14200, aprovou todos os procedimentos realizados no presente estudo.

A porção livre de gel de cada ejaculado foi pesada para mensuração do volume seminal e realizada uma avaliação visual da presença de contaminantes. O pH do sêmen medido usando um medidor de pH manual (a) disponível no mercado. O pH do sêmen aceitável foi considerado inferior a 7,7^{5,14}. Uma pequena alíquota de sêmen bruto foi congelada em tubos criovacs para medição de ureia e creatinina usando um analisador automatizado quantitativo (b). Os valores normais aceitáveis para ureia e creatinina no sêmen garanhão são $<30\text{mg} / \text{dL}$ e $<2 \text{mg} / \text{dL}$, respectivamente⁵. As amostras de sêmen com alta concentração de ureia e creatinina ou pH alcalino (> 8) foram diagnosticadas com urospermia^{2,19,13} e descartadas.

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade e vigor, e somente os ejaculados que apresentavam valores dentro da normalidade foram utilizados no experimento. A concentração do sêmen foi determinada usando-se um espectrofotômetro (c) de acordo com as instruções do fabricante. O sêmen foi então alocado em tubos cônicos de 50 mL. Adicionou-se 10 mL de sêmen bruto ao tubo de controle (CON), 8 mL de sêmen bruto ao tubo 2 de "baixa contaminação" (BAIXA) e 5 mL de sêmen bruto ao tubo de "alta contaminação" (ALTA). Foram adicionados dois mL de urina a cada tubo BAIXA, e cinco mL de urina foram adicionados a cada tubo ALTA. Uma vez que o sêmen foi exposto à urina durante 2 minutos, cada um dos tubos foi diluído para 40 mL com um diluidor de sêmen à base de leite (d).

Após a extensão, adicionou-se 1 mL da solução de "cushion" de sêmen (e) no fundo de cada tubo cônico com o uso de uma agulha de coluna longa (18G 3,5")²⁰. Todos os tubos foram então centrifugados à temperatura ambiente a 1000 g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante e a solução de "cushion" foram aspirados e descartados.

Centrifugação com gradiente de densidade

As amostras foram novamente suspensas num diluidor à base de leite comercialmente disponível e depois centrifugadas através de 3 mL de EquiPure™ a 400 x g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante (excesso de EquiPure™ e de espermatozoides não viáveis) foi removido da parte superior dos tubos das amostras, deixando-se apenas o sêmen viável no sedimento. O sedimento de sêmen remanescente foi ressuspenso com um diluidor de congelamento comercialmente disponível (f) para uma concentração final de 200 milhões de espermatozoides / mL. O sêmen foi então envasado manualmente em palhetas de 0,5 mL e depois arrefecido a 5 ° C durante 20 minutos. Para congelamento, o sêmen foi então colocado sob uma grade a 4 cm acima do nitrogênio líquido durante 15 minutos antes de ser mergulhado em nitrogênio líquido. As amostras criopreservadas foram armazenadas em botijão de nitrogênio até análises posteriores.

Análise da motilidade espermática

Imediatamente antes do congelamento do sêmen e após o descongelamento, uma amostra de cada ejaculado foi diluída com um diluidor à base de leite para 20 milhões de espermatozoides / mL. A amostra foi avaliada para motilidade total e progressiva por meio da análise de sêmen assistida por computador (CASA) (g) usando-se as configurações padrão para o sêmen de equino conforme recomendado pelo fabricante. Além disso, foram avaliados outros parâmetros anteriormente relacionados à motilidade e função normais (velocidade curvilínea (VCL), progressão angular (VAP), velocidade linear (VSL), retidão (STR), amplitude da cabeça lateral (ALH) e linearidade (LIN)¹⁷.

Citometria de fluxo

O sêmen de garanhão previamente criopreservado (200 milhões de espermatozoides por mililitro) foi descongelado a 37° C durante 1 minuto para análise e os três protocolos de coloração seguintes foram implementados (viabilidade espermática e potencial de membrana mitocondrial; integridade do acrossoma; estabilidade da cromatina espermática). As amostras foram analisadas usando um analisador de citometria de fluxo BD LSR II (h) no Centro de Biotecnologia da Universidade do Illinois.

Integridade da membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial

As associações das sondas fluorescentes de SYBR-14 (i) (0,02 mM em DMSO), PI (j) (2,4 mM em água) e JC-1 (3 mM em DMSO) foram preparadas como descrito anteriormente na literatura¹⁶. As concentrações finais das sondas foram 100 nM de SYBR-14, 12 µM PI e 3 µM de JC-1. Foram adicionados 5 µL de sêmen descongelado a 0,5 mL de solução de coloração para criar uma concentração final de 2 milhões de espermatozoides por mililitro. A amostra foi misturada por pipetagem reversa e incubada a 37° C durante 30 minutos.

Os três corantes foram excitados usando um laser de excitação de argônio de 488 nm. Um total de 20.000 espermatozoides foram coletados e analisados a uma taxa de fluxo de 200 células / s. Os debris foram descartados com base nos espermatozoides que emitiram uma mínima fluorescência vermelha e verde. Foram esperadas quatro populações de espermatozoides nas preparações de sêmen manchadas com SYBR-14 / PI / JC-1²¹. As células presuntivamente viáveis compõem as populações 1 e 3, com sinal fluorescente verde (SYBR-14 positivo) detectado na cabeça e / peça intermediária usando detector de fluorescência 1 (detecta fótons emitidos no comprimento de onda de 515-545 nm). A população 1 inclui células espermáticas viáveis com peças intermediárias que se coram fracamente de laranja devido à formação de monômeros. A população 3 inclui células de espermatozoides viáveis com peças intermediárias coradas de laranja devido à formação de agregados JC em alto potencial de membrana mitocondrial (hMMP). A população 2 perde a cor laranja na parte intermediária, adquirindo tonalidade verde fraca (monômero), então a quantidade de verde nesse sêmen é menor que as populações 1/3 que são verdes devido a SYBR. A população 2 é laranja / vermelho devido a PI na cabeça e verde devido à parte intermediária. A população 4 inclui aqueles espermatozoides

que não estão intimamente associados com a população 1, 2 ou 3. A média e o SD da fluorescência do canal verde e vermelho foram medidos para cada população.

Integridade do acrossoma

As sondas fluorescentes de FITC-PNA (k) (1 mg / mL em PBS) foram preparadas como descrito anteriormente na literatura²². As concentrações finais das sondas foram 1,5 μ M de Iodeto de Propídeo - PI e 1 μ g / mL de FITC-PNA. Foram adicionados 5 μ L de sêmen de garanhão descongelado a 0,5 mL de solução de coloração para uma concentração final de 2 milhões de espermatozoides / mL. A amostra foi misturada por pipetagem reversa e incubada a 37° C durante 10 a 15 minutos. A fluorescência FITC-PNA foi detectada no detector de fluorescência 515-545 nm. Os espermatozoides não espermáticos foram excluídos das análises, conforme avaliado nas propriedades de dispersão. Foram registrados 20 mil espermatozoides fechados e desenhadas tramas bidimensionais de espermatozoides de fluorescência FITC-PNA versus PI. As subpopulações foram subdivididas por quadrantes e a frequência de cada subpopulação quantificada.

Estabilidade da cromatina espermática

A estabilidade da cromatina foi avaliada por coloração metacromática com laranja de acridina (AO) com base na susceptibilidade do DNA do sêmen a desnaturação induzida por ácido in situ como descrito anteriormente na literatura²³. Este é um corante de ligação de ácido nucléico permeável às células que emite fluorescência verde quando ligado a dsDNA e fluorescência vermelha quando ligado a ssDNA ou RNA. Foram adicionados 10 μ L de sêmen descongelado a 990 μ L de PBS para criar uma concentração final de sêmen de 2 milhões de espermatozoides por mililitro. A desnaturação induzida por ácido in situ do DNA foi obtida pela adição de 0,4 mL de uma solução detergente de ácido (0,1% Triton X-100, NaCl 0,15 M e HCl 0,08 N, pH 1,4) a 0,2 mL de sêmen diluído. Após 30 segundos, as células foram coradas adicionando-se 1,2 mL de uma solução (0,1 M de ácido cítrico, 0,2 M de Na₂HPO₄, 1 mM de EDTA, NaCl 0,15 M, pH 6,0) contendo 6 μ g / mL de AO (I). As amostras coradas foram analisadas 3 minutos após a coloração com AO. A análise de citometria de fluxo foi realizada

como acima. Os dados correspondentes à fluorescência vermelha e verde das partículas adquiridas foram registrados (os resíduos foram descartados eletronicamente).

Morfologia espermática

Alíquotas de ejaculados e de amostras centrifugadas foram fixadas em solução salina de formol para contagem de 200 espermatozoides em preparações úmidas (x1000) para determinação de espermatozoides com morfologia anormal (%). A proporção média de espermatozoides morfolologicamente normais foi estimada e as anormalidades foram classificadas como defeitos maiores (gota citoplasmática proximal, carda fortemente dobrada, defeito da peça intermediária) e defeitos menores (gota citoplasmática distal, cabeça normal sem cauda, curvatura simples, cabeça estreita). Os exames morfológicos foram realizados no Laboratório de Sêmen da Clínica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da Universidade do Illinois.

Análise estatística

Os dados são apresentados como médias \pm SEM. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do programa R de software estatístico e gráfico gratuito integrado versão 3.2.2 (www.r-project.org/). Os dados de citometria de fluxo e motilidade foram analisados por medidas repetidas de ANOVA. Foram realizadas análises de correlação sobre os resultados da morfologia e cromatina. Os testes Tukey HSD foram realizados conforme necessário para análise pós-hoc.

Resultados

Houve uma redução significativa nas motilidades total e progressiva do sêmen pré-congelado com o aumento da concentração de urina. As motilidades total e progressiva pós-congelamento não foram significativamente diferentes entre si (tabela 1).

Não houve uma redução significativa nos resultados para VCL e VAP em ambos os grupos pré-congelamento e pós-congelamento, no entanto, uma redução significativa foi observada para VSL nos grupos com alta contaminação por urina. Nenhuma diferença foi observada nos resultados para LIN e STR entre qualquer grupo (tabela 2).

Tabela 1: Motilidades espermáticas de amostras submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação de urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 25 ejaculados), pré-congelamento e pós-descongelamento.

Tratamento	pH	Pré-congelamento		Pós-descongelamento	
		Motilidade total	Motilidade progressiva	Motilidade total	Motilidade progressiva
Controle	7.53 ± 0.03 ^a	69.0 ± 1.8 ^a	50.9 ± 2.1 ^a	54.2 ± 2.2	41.1 ± 3.5
Baixa	8.4 ± 0.04 ^b	60.9 ± 1.6 ^b	44.5 ± 2.3 ^b	52.6 ± 1.9	36.7 ± 2.3
Alta	8.7 ± 0.03 ^c	42.5 ± 2.1 ^c	23.1 ± 1.6 ^c	49.9 ± 1.3	32.8 ± 1.1

Letras diferentes dentro das colunas demonstram diferenças estatísticas (p<0.05).

Tabela 2: Velocidades espermáticas de amostras submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação de urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 25 ejaculados), pré-congelamento e pós-descongelamento.

Tratamento	VCL ¹ (µm/ sec)	VAP ² (µm/ sec)	VSL ³ (µm/ sec)	LIN ⁴ (%)	STR ⁵ (%)
Pré-congelamento					
Controle	180 ± 27.5	99.7 ± 15.5	75.0 ± 13.1 ^a	0.44 ± 0.07	0.78 ± 0.05
Baixa	177.4 ± 31.0	95.8 ± 15.1	72.1 ± 13.5 ^a	0.43 ± 0.05	0.78 ± 0.07
Alta	169.5 ± 39.6	87.8 ± 18.4	63.4 ± 15.7 ^b	0.41 ± 0.07	0.77 ± 0.06
Pós-descongelamento					
Controle	179.1 ± 27.9	99.1 ± 15.9	74.3 ± 13.2 ^a	0.41 ± 0.07	0.72 ± 0.03
Baixa	175.6 ± 31.3	94.1 ± 15.2	70.9 ± 14.5 ^a	0.39 ± 0.05	0.71 ± 0.05
Alta	168.2 ± 39.9	87.2 ± 18.2	61.7 ± 16.8 ^b	0.38 ± 0.09	0.69 ± 0.06

Letras diferentes dentro das colunas demonstram diferenças estatísticas (p<0.05).

¹VCL – Velocidade curvilínea

²VAP – Velocidade média do trajeto

³VSL – Velocidade linear

⁴LIN – Linearidade

⁵STR – Retilinearidade

A viabilidade do sêmen pós-descongelamento foi semelhante nos grupos controle ($64,5 \pm 2,2$), baixa contaminação ($65,7 \pm 3,3$) e alta contaminação ($62,6 \pm 2,4$). Não foram observadas diferenças na integridade do acrossoma ou na estabilidade da cromatina espermática entre os grupos (tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da viabilidade e potencial mitocondrial (SYBR-14 / PI / JC-1), integridade do acrossoma (FITC-PNA) e integridade da cromatina (AO) de sêmen de garanhão criopreservado após nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação por urina (baixa) ou 50% de contaminação por urina (alta) (n = 25 ejaculados).

Parâmetro	Controle	Baixa	Alta
DNA espermático intacto (%)	82.3 ± 2.8	79.8 ± 3.3	71.9 ± 5.6
DNA espermático danificado (%)	18.1 ± 2.9	20.1 ± 3.5	27.9 ± 5.8
Morto, acrossoma intacto	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1
Morto, acrossoma danificado	32.4 ± 0.8	34.8 ± 1.8	45.1 ± 2.5
Vivo, acrossoma intacto	23.9 ± 4.5	22.7 ± 3.3	22.1 ± 2.7
Vivo, acrossoma danificado	42.9 ± 4.7	41.8 ± 3.1	33.1 ± 2.5
Vivo, mitocôndria polarizada	8.0 ± 1.3	7.7 ± 1.3	8.7 ± 1.3
Vivo, mitocôndria despolarizada	56.5 ± 2.2	58.0 ± 3.5	53.9 ± 3.7
Morto (deformação tripla)	36.1 ± 2.3	34.5 ± 3.2	44.8 ± 3.5

Letras diferentes dentro das colunas demonstram diferenças estatísticas ($p < 0.05$).

A seleção de espermatozoides morfológicamente normais foi melhorada após a centrifugação com gradiente de densidade. A diferença entre amostras de controle e amostras contaminadas foi significativa ($p < 0,001$), mas não houve diferença entre grupos com baixa e alta contaminação em ambas as amostras pré-centrifugadas e pós-centrifugadas (tabela 4).

A seleção melhorada de espermatozoides morfológicamente normais reduziu as anormalidades morfológicas das amostras após a centrifugação com gradiente de densidade. A redução da incidência de gotículas citoplasmáticas proximais, defeitos da peça intermediária e curvatura simples foram consideráveis. A diminuição da incidência de gotículas citoplasmáticas distais não foi estatisticamente significativa. Não foram encontrados defeitos como cabeças piriformes, mal-desenvolvimento, crateras, implantação abaxial e acrossomas anormais em ambas as amostras pré-centrifugadas e pós-centrifugadas (tabelas 5 e 6).

Tabela 4: Proporção de espermatozoides com morfologia normal das amostras submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação de urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 25 ejaculados), pré-centrifugação e pós-centrifugação.

Tratamento	Morfologia espermática normal (%)	
	Pré-centrifugação	
Controle		67 ^a
Baixa		54.5 ^b
Alta		53 ^b
	Pós-centrifugação	
Controle		68.5 ^a
Baixa		59 ^b
Alta		58 ^b

Redução em % de Controle para Baixa e Alta foi estatisticamente significativa (p <0,001); As diferenças entre Baixa e Alta não são significativas.

Tabela 5: Anormalidades morfológicas maiores das amostras submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação de urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 25 ejaculados), pré-centrifugação e pós-centrifugação.

	Pré-centrifugação			Pós-centrifugação			
	Controle	Baixa	Alta	Controle	Baixa	Alta	
DEFEITOS MAIORES							
Gota citoplasmática proximal	11.8	7.8	7.1	11.3	7.2	7.0	a
Cabeça piriforme	0	0	0	0	0	0	
Cauda fortemente dobrada ou enrolada	0.9	0.4	0.3	0.8	0.2	0.1	a
Defeito da peça média	4.3	0.4	0.3	4.1	0.3	0.3	b
Mal desenvolvido	0	0	0	0	0	0	
Cratera	0	0	0	0	0	0	

^a Redução em % da morfologia anormal de Controle para Baixa e Alta foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) e as diferenças entre Baixa e Alta não são significativas.

^b Redução em % da morfologia anormal de Controle para Baixa e Alta foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e as diferenças entre Baixa e Alta não são significativas.

Tabela 6: Anormalidades morfológicas menores das amostras submetidas a nenhum tratamento (Controle), 20% de contaminação de urina (baixa) ou 50% de contaminação de urina (alta) (n = 25 ejaculados), pré-centrifugação e pós-centrifugação.

	Pré-centrifugação			Pós-centrifugação			
	Controle	Baixa	Alta	Controle	Baixa	Alta	
DEFEITOS MENORES							
Gota citoplasmática distal	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	c
Cabeça normal sem cauda	1.1	0.3	0.2	1.1	0.2	0.1	a
Curvatura simples	5.6	1.1	1.0	5.3	1.0	1.0	b
Cabeça estreita, pequena ou gigante	4.1	0.2	0.1	3.8	0.3	0.2	b
Implantação abaxial	0	0	0	0	0	0	
Acrossomas anormais	0	0	0	0	0	0	

^a Redução em % da morfologia anormal de Controle para Baixa e Alta foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) e as diferenças entre Baixa e Alta não são significativas.

^b Redução em % da morfologia anormal de Controle para Baixa e Alta foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) e as diferenças entre Baixa e Alta não são significativas.

^c Diferenças entre Controle, Baixa e Alta não são significativas.

Discussão

Conforme demonstrado em outros estudos, o uso de um gradiente de densidade de partículas de sílica-silanizada (Equipure™) pode melhorar a qualidade do sêmen não urospérmico de garanhões, tanto em relação à motilidade quanto à morfologia espermática²⁴. Também em cães, o uso de um gradiente de densidade melhorou a qualidade do sêmen canino não urospérmico danificado pelo processo de congelamento-descongelamento, resultando em um sêmen presumivelmente com maior potencial de fertilização, já que a maioria dos parâmetros espermáticos de qualidade foram melhorados em comparação com as amostras de controle²⁷. No entanto, em todos esses estudos com gradiente de densidade foi utilizado sêmen não urospérmico de cavalos e/ou cães, nenhum outro estudo além do nosso avaliou o efeito do gradiente de densidade em sêmen equino contaminado com urina, o que abre oportunidades para novos estudos.

Em sêmen urospérmico de urso marrom, a centrifugação em gradiente de densidade melhorou a motilidade e a viabilidade espermáticas, bem como selecionou espermatozoides com maior capacidade para sobreviver ao processo de criopreservação, até mesmo após dois ciclos de congelamento-descongelamento^{28,29}.

Nosso estudo abordou se os ejaculados equinos contaminados com urina poderiam ser melhorados após a centrifugação com gradiente de densidade. Houve uma redução significativa na motilidade total e progressiva dos espermatozoides com o aumento da contaminação urinária no pré-congelamento. No entanto, não houve diferença significativa em relação às motilidades pós-descongelamento para todos os grupos. O sêmen fresco urospérmico de urso marrom, também foi melhorado após o tratamento com centrifugação com gradiente de densidade²⁵. Ainda no sêmen urospérmico do urso marrom, o gradiente PureSperm® melhorou a eficácia do segundo ciclo de congelamento-descongelamento, obtendo valores semelhantes de motilidade total, viabilidade e integridade acrossomal no PS-Pellet após o segundo ciclo em comparação com os valores de controle no primeiro ciclo²⁵.

Em cães, espermatozoides selecionados com gradiente de densidade apresentaram velocidades mais altas²⁷, e tais espermatozoides com velocidades elevadas são marcadores de fertilidade para ambas as fertilidades *in vivo* e *in vitro*³⁰.

A centrifugação com gradiente de densidade é usada não só para separar células espermáticas móveis, mas também para a remoção de agentes contaminantes, como plasma

seminal, leucócitos, contaminação microbiana e outros detritos¹⁸. Vários tipos de defeitos morfológicos espermáticos foram separados diferencialmente ao longo de um gradiente de densidade, resultando em uma alta porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais no pellet, o que faz os protocolos de centrifugação com gradiente de densidade serem úteis para avaliações dos efeitos das diferentes anormalidades morfológicas na fertilidade *in vivo* e *in vitro*²⁴.

Em cães, embora tenha havido uma tendência para que a porcentagem dos espermatozoides morfologicamente normais melhorassem após a seleção com gradiente de densidade, essas diferenças não alcançaram significância estatística²⁷. Neste estudo, a porcentagem de anormalidades morfológicas do sêmen urospérmico equino foram reduzidas após a centrifugação com gradiente de densidade.

A primeira tentativa de usar a centrifugação com gradiente de densidade para separar o sêmen canino não urospérmico criopreservado, selecionou uma população espermática com qualidade melhorada em relação à maior motilidade, viabilidade e integridade do acrossoma. Embora houvesse uma tendência para os espermatozoides morfologicamente normais melhorarem após a seleção do gradiente, essas diferenças não atingiram significância estatística²⁷.

Em nosso estudo, não foram observadas diferenças na qualidade do DNA espermático e na integridade do acrossoma com o aumento da contaminação da urina, enquanto que no sêmen urospérmico do urso marrom, o número de acrossomas danificados foi menor para a centrifugação com gradiente de densidade²⁶.

Conclusões

O estudo demonstrou que a contaminação do ejaculado de garanhão com urina reduz substancialmente a motilidade do sêmen e o uso de uma centrifugação por gradiente de densidade pode ser um método bem sucedido para melhorar a qualidade do sêmen danificado pela urina em garanhões, especialmente a qualidade do sêmen pós-descongelado. Vários parâmetros espermáticos foram melhorados no sêmen urospérmico equino e essas amostras mostram uma melhor resistência aos impactos prejudiciais do congelamento e ao prolongamento da sobrevivência dos espermatozoides garanhões para inseminação. Além disso, a centrifugação

com gradiente de densidade foi efetiva na melhoria da seleção de espermatozoides com morfologia normal no sêmen urospérmico de garanhões.

Os resultados sugerem que o sêmen contaminado com as quantidades de urina utilizadas no estudo pode ser utilizado para criopreservação, inclusive no sêmen com alta contaminação por urina, a centrifugação com gradiente de densidade foi capaz de melhorar a motilidade das amostras. Apesar do valor comercial elevado, este método é relativamente fácil de usar e estudos adicionais devem ser realizados para otimizar a taxa de recuperação do sêmen urospérmico equino após a centrifugação com gradiente de densidade.

Notas de rodapé

- (a) LAQUA Twin, Horiba Inc., Irvine, CA, 92618
- (b) Beckman Coulter, Pasadena, CA 92821
- (c) Equine Densimeter II, ARS, Chino, CA 917
- (d) Equi-Pro[®] Cool Guard[®], MOFA Global, Vernon, WI 53593
- (e) Maxifreeze[®], IMV, Maple Grove, MN 55369
- (f) BotuCrio, Biotech Botucatu, Botucatu, Sao Paulo, Brazil
- (g) Spermvision II[®], MOFA Global, Verona, WI, 53593
- (h) BD Biosciences, San Jose, CA, 95131
- (i) Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)
- (j) Sigma Chemical Co., St. Louis, MI
- (k) Sigma Chemical Co., St. Louis, MI
- (l) Polysciences, Inc., Warrington, PA

Agradecimento

A Fundação Americana do Cavalo Quarto de Milha pelo suporte financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí.

Declaração de Ética

Os autores afirmam ter aderido aos Princípios da Ética Médica Veterinária da Associação Americana de Medicina Veterinária.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; BRETZLA, K.N.; MORRIS, D.L.; ELMORE, R.G. Male reproductive disorders. In: SMITH, B.P. Large Animal Internal Medicine, 1st ed. St. Louis – MO, 1990.
2. Voge, J.; Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Meschini, M.; Turner, C.; Teague, S.R.; Brinsko, S.P.; Love, C.C. The effects of urine concentration, and "cushion" centrifugation to remove urine, on the quality of cool-stored stallion sperm. *Theriogenology*, 86 (5) 1294-1298, 2016.
3. KIM, S.C.; KIM, H.W. Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an *in vitro* study. *International Journal of Andrology*, 21, 29-33, 1998.
4. SANTOS, I.P.; CUHNA, I.C.P.; MELO, E.T.J. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. *Animal Reproduction*, 8, 73-79, 2011.
5. GRIGGERS, S; PACAMONTI, D.L; THOMPSON, R.A; EILTS, B.E. The effects of pH, osmolality and urine contamination on equine spermatozoa motility. *Theriogenology*, 56, 613-622, 2001.
6. Wirtu, G.; Pope, C.E.; MacLean, R.A.; Godke, R.A.; Paccamonti, D.L.; Dresser, B.L. Reversal of motility loss in bongo antelope (*Tragelaphus eurycerus isaaci*) spermatozoa contaminated with hypo-osmotic urine during electro-ejaculation. *Animal Reproduction Science*, 103, 392-397, 2008.
7. McCUE, P.M. Urospermia or urine in the semen – Article in *Animal Reproduction Systems*, 2014. Available in <http://www.arssales.com/Urospermia.html>
8. MAYHEW, I.G. Neurological aspects of urospermia in the horse. *Equine Veterinary Education*, 2 (2) 68-69, 1990.
9. DeBOWES, R.M. Management of vertebral fractures. In: WHITE, N.A.; MOORE, J.N. (Eds.) *Current Practice of Equine Surgery*, 1st ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1990.

10. VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; TAYLOR, T.S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. *Animal Reproduction Science*, 60-61:493-509, 2000.
11. BRINSKO, S.P. Retrograde ejaculation in a stallion. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 218, 551-553, 2001.
12. LEENDERTSE, I.P.; ASBURY, A.C.; BOENING, K.J.; SALDERN, F.C. Successful management of persistent urination during ejaculation in a Thoroughbred stallion. *Equine Veterinary Education*, 2, 62-64, 1990.
13. BALL, B.A. Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28 (11), 2008.
14. Ellerbrock, R.; Canisso, I.; Feijo, L.; Lima, F.; Shipley, C.; Kline, K. Diagnosis and effects of urine contamination in cooled-extended stallion semen. *Theriogenology*, 85, 1219-1224, 2016.
15. KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. Manual for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion. Society for Theriogenology, Hasrings, NB, 1983.
16. TURNER, R.M.O.; LOVE, C.C.; MCDONNELL, S.M.; SWEENEY, R.W.; TWITCHELL, E.D.; HABECKER, P.L.; REILLY, L.K.; POZOR, M.A.; KENNEY, R.M. Use of imipramine hydrochloride for treatment of urospermia in a stallion with a dysfunctional bladder. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 207, 1602-1606, 1995.
17. MORTIMER, D. Sperm preparations methods. *Journal of Andrology*, 21 (3) 357-366, 2000.
18. ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MURIEL, A.; MACÍAS-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ALONSO, J.M.; PENA, F.J. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 518-522, 2009.
24. MACPHERSON, M.L.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated sêmen in stallions. *Theriogenology*, 58, 317-320, 2002.
25. GOMES-ALVES, S.; ALVAREZ, M.; NICOLAS, M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; BORRAGÁN, S.; CHAMORRO, C.A.; ANEL, L.; PAZ, P. de. Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). *Animal Reproduction Science*, 150, 148-157, 2014.
26. ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL-LÓPEZ, L.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; MANRIQUE, P.; BORRAGÁN, S.; MORRELL, J.M.; PAZ, P. de; ANEL, L. Effect of colloid

- (Androcoll-Bear, Percoll, and PureSperm) selection on the freezability of brown bear (*Ursus arctos*) sperm. *Theriogenology*, 85, 1097-1105, 2016.
27. DORADO, J.; ALCARÁZ, L.; DUARTE, N.; PORTERO, J.M.; ACHA, D.; DEMYDA, S.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, 76, 381-385, 2011.
28. ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M., ALVAREZ, M., LOPEZ-URUEÑA, E., MARTINEZ-RODRIGUEZ,C., BORRAGAN, S., ANEL-LOPEZ, L., DE PAZ, P., ANEL, L. Brown bear sperm double freezing: effect of elapsed time and use of PureSperm® gradient between freeze-thaw cycles. *Cryobiology*, 67, 339-346, 2013.
29. GOMES-ALVES, S.; ALVAREZ, M.; NICOLAS, M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; BORRAGÁN, S.; CHAMORRO, C.A.; ANEL, L.; PAZ, P. de. Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). *Animal Reproduction Science*, 150, 148-157, 2014.
30. SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINEIA, V.H.; LOPES, M.D.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on *in vitro* sperm-oocyte interactions. *Theriogenology*, 66, 456-462, 2006.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tanto a centrifugação com "cushion" quanto a centrifugação com gradiente de densidade são métodos de processamento seminal capazes de aumentar a qualidade de sêmen urospérmico de garanhões. A centrifugação com gradiente de densidade foi ainda capaz de aumentar a motilidade de amostras urospérmicas com alta contaminação por urina e de selecionar maiores quantidades de células espermáticas com morfologia normal. A centrifugação com gradiente de densidade pode ainda ser utilizada para separação de defeitos morfológicos espermáticos e avaliação dos efeitos específicos de cada defeito na fertilidade.

Por fim, ainda existe a necessidade de se avaliar os efeitos no endométrio de éguas inseminadas com amostras de sêmen urospérmico de garanhões, bem como a realização de testes de fertilidade "*in vivo*".

REFERÊNCIAS

ALTHOUSE, G.C.; SEAGER, S.W.J.; VARNER, D.D.; WEBB, G.W. Diagnostic aids for the detection of urine in the equine ejaculate. **Theriogenology**, 31, 1141-1148, 1989.

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M., ALVAREZ, M., LOPEZ-URUEÑA, E., MARTINEZ-RODRIGUEZ, C., BORRAGAN, S., ANEL-LOPEZ, L., DE PAZ, P., ANEL, L. Brown bear sperm double freezing: effect of elapsed time and use of PureSperm® gradient between freeze-thaw cycles. **Cryobiology**, 67, 339-346, 2013.

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL-LÓPEZ, L.; LÓPEZ-URUEÑA, E.; MANRIQUE, P.; BORRAGÁN, S.; MORRELL, J.M.; PAZ, P. de; ANEL, L. Effect of colloid (Androcoll-Bear, Percoll, and PureSperm) selection on the freezability of brown bear (*Ursus arctos*) sperm. **Theriogenology**, 85, 1097-1105, 2016.

ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ALVAREZ, M.; BORRAGAN, S.; MARTINEZ-PASTOR, F.; HOLT, W.V.; FAZELI, A.; PAZ, P. de; ANEL, L. The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. **Theriogenology**, 79, 541-550, 2013.

ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GOMES, S.; NICOLAS, M.; MATA, M.; MARTINEZ, A.F.; BORRAGAN, S.; ANEL, E.; PAZ, P. de. Sperm cryopreservation in Brown Bear (*Ursus arctos*): Preliminary Aspects. **Reproduction of Domestic Animals**, 43 (4), 9-17, 2008.

ANEL, L.; GOMES-ALVES, S.; ALVAREZ, M.; BORRAGAN, S.; ANEL, E.; NICOLAS, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; PAZ, P. de. Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electro-ejaculated spermatozoa. **Theriogenology**, 74, 643-651, 2010.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, Citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.

BALL, B.A. Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**, 28 (11), 2008.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; BRETZLA, K.N.; MORRIS, D.L.; ELMORE, R.G. Male reproductive disorders. In: SMITH, B.P. **Large Animal Internal Medicine**, 1st ed. St. Louis – MO, 1990.

BLISS, S.B.; VOGEL, J.L.; HAYDEN, S.S.; TEAGUE, S.R.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C. The impact of "cushion"ed centrifugation protocols on sêmen quality of stallions. **Theriogenology**, 77, 1232-1239, 2012.

BOURKE, D.A.; KYLE, C.E.; MCEVOY, T.G.; YOUNG, P.; ADAM, C.L. Advanced reproductive technologies in South American Camelids. In: GERKEN, M.; RENIERI, C. (Eds.), **Proceedings of the 2nd European Symposium on South American Camelids**. Publ Universita degli Studi di amerino, 1995.

BOYLE, M. The investigation of stallion fertility problems. **Equine Veterinary Education**, 2 (2) 65-61, 1990.

BRINSKO, S.P. et al. **Manual of Equine Reproduction** (Third edition), Mosby Elsevier, 2002.

BRINSKO, S.P. Retrograde ejaculation in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 218, 551-553, 2001.

CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electro-ejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. **Canadian Veterinary Journal**, 45, 2004.

CHEN, D.; SCOBAY, M.J.; JEYENDRAN, R.S. Effects of urine on the functional quality of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, 64, 1216-1217, 1995.

CHEN, L.M.; HOU, R.; ZHANG, Z.H.; WANG, J.S.; AN, X.R.; CHEN, Y.F.; ZHENG, H.P.; XIA, G.L.; ZHANG, M.J. Electro-ejaculation and sêmen characteristics of Asiatic black bears (*Ursus thibetanus*). **Animal Reproduction Science**, 101, 358-364, 2007.

CHEN, M.; BONGSO, A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. **Human Reproduction**, 14 (3) 759-764, 1999.

COX, J. E. Experience with a diagnostic test for equine cryptorchidism. **Equine Veterinary Journal**, 7, 179, 1975.

DANEK, J.; WISNIEWSKI, E.; KRUMRYCH, W. A case of urospermia in a stallion. **Medycyna-Weterynaryjna**, 50, 129-131, 1994.

DASCANIO, J.J.; WITONSKY, S.G. Theriogenology: question of the month. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 227, 225-227, 2005.

DeBOWES, R.M. Management of vertebral fractures. In: WHITE, N.A.; MOORE, J.N. (Eds.) **Current Practice of Equine Surgery**, 1st ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1990.

DELFIUO, D.J.Z.; OLIVEIRA-FILHO, J.P. de; BATAZZA, A.; SOUZA, C.P. de; BADIAL, P.R.; ARAUJO JUNIOR, J.P.; BORGES, A.S. Prevalência da mutação causadora da paralisia periódica hipercalêmica em equinos da raça Quarto de Milha no Brasil. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, 2015.

ELLERBROCK, R.; CANISSO, I.; FEIJO, L.; LIMA, F.; SHIPLEY, C.; KLINE, K. Diagnosis and effects of urine contamination in cooled-extended stallion sêmen. *Theriogenology*, 85, 1219-1224, 2016.

ESTRADA, A.; SAMPER, J.C.; LILLICH, J.D.; RATHI, R.R.; BRAULT, L.S.; ALBRECHT, B.B.; IMEL, M.M.; SENNE, E.M. Azoospermia associated with bilateral segmental aplasia of the ductus deferens in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 222 (12), 2003.

FERNANDEZ BACA, S. Manipulation of reproductive functions in male and female New World Camelids. **Animal Reproduction Science**, 33, 307-323, 1993.

GIULIANO, S.; DIRECTOR, A.; GAMBAROTTA, M.; TRASORRAS, V.; MIRAGAYA, M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). **Animal Reproduction Science**, 104, 359-369, 2008.

GOMES-ALVES, S.; ALVAREZ, M.; NICOLAS, M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; BORRAGÁN, S.; CHAMORRO, C.A.; ANEL, L.; PAZ, P. de. Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). **Animal Reproduction Science**, 150, 148-157, 2014.

GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; MORRELL, J.M.; PENA, F.J.; MACIAS-GARCIA, B. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. **Theriogenology**, 78, 415-422, 2012.

GRIGGERS, S; PACAMONTI, D.L; THOMPSON, R.A; EILTS, B.E. The effects of pH, osmolality and urine contamination on equine spermatozoa motility. *Theriogenology*, 56, 613-622, 2001.

HELD, J.P.; McCracken, M.D.; TOAL, R.; LATIMER, F. Epididymal swelling attributable to generalized lymphosarcoma in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 201, 1913-1915, 1992.

HOYOS SEPÚLVEDA, M.L.; ROCHA, G.F.Q.; BRUMBAUGH, G.W.; MONTIEL, Q.; RODRIGUEZ, M.; MORALES, E.C. Lack of Beneficial Effects of Bethanechol, Imipramine or Furosemide on Seminal Plasma of Three Stallions with Urospermia. **Reproduction of Domestic Animals**, 34, 489-493, 1999.

IETJE, P.; LEENDERTSE, A.C.; ASBURY, K.J.; BOENING, F.C.; SALDERN, V. Successful management of persistent urination during ejaculation in a Thoroughbred stallion. **Equine Veterinary Education**, 2 (2) 62-64, 1990.

JASKO, D.J. Evaluation of stallion sêmen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 7, 018- 037, 1992.

JOHNSON, A.K.; LOVE, C.C.; CASILLO, A.L.; POOL, R.R. Mesothelioma of the tunica vaginalis testes in a stallion. **Equine Veterinary Education**, 20 (9) 480-484, 2008.

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion**. Society for Theriogenology, Hasrings, NB, 1983.

KIM, S.C.; KIM, H.W. Effects of nitrogenous components of urine on sperm motility: an *in vitro* study. **International Journal of Andrology**, 21, 29-33, 1998.

KOJIMA, E.; TSURUGA, H.; KOMATSU, T.; MURASE, T.; TSUBOTA, T.; KITA, I. Characterization of sêmen collected from beagles and captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Theriogenology**, 55, 717-731, 2001.

LEENDERTSE, I.P.; ASBURY, A.C.; BOENING, K.J.; SALDERN, F.C. Successful management of persistent urination during ejaculation in a Thoroughbred stallion. **Equine Veterinary Education**, 2, 62-64, 1990.

LOWE, J.N. Diagnosis and management of urospermia in a commercial Thoroughbred stallion. **Equine Veterinary Education**, 13 (1) 4-7, 2001.

MACPHERSON, M.L.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated sêmen in stallions. **Theriogenology**, 58, 317-320, 2002.

MAKLER, A.; DAVID, R.; BLUMENFELD, Z.; BETTER, O.S. Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affected by change of pH and osmolality of sêmen and urine specimens. **Fertility and Sterility**, 36, 507-511, 1981.

MAYHEW, I.G. Neurological aspects of urospermia in the horse. **Equine Veterinary Education**, 2 (2) 68-69, 1990.

McCUE, P.M. Urospermia or urine in the sêmen – Article in **Animal Reproduction Systems**, 2014. Available in <http://www.arssales.com/Urospermia.html>

McDONNELL, S.M. Ejaculation physiology and dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 8, 57-70, 1992.

McKINNON, A.O. Some selected diseases of the breeding stallion. In: Reproducción equina III: Trabajos presentados en el Tercer Congreso Argentino de Reproducción Equina / 1a ed. - Río Cuarto: UniRío Editora, 2013.

McKINNON, A.O.; McCUE, P.M. Uterine abnormalities. In: Reproducción equina III: Trabajos presentados en el Tercer Congreso Argentino de Reproducción Equina / 1a ed. - Río Cuarto: UniRío Editora, 2013.

MORRELL, J.M., DALIN, A.M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. **Equine Veterinary Journal**, 41, 53-58, 2009.

MORRELL, J.M.; GERAGHTY, R.J. Effective removal of equine arteritis virus from stallion sêmen. **Equine Veterinary Journal**, 38, 224-229, 2006.

MORTIMER, D. Sperm preparations methods. **Journal of Andrology**, 21 (3) 357-366, 2000.

MRÁCKOVÁ, M.; ZAVADILOVÁ, M.; SEDLINSKÁ, M. Assessment of the effect of selected components of equine seminal plasma on sêmen freezability. **Macedonian Veterinary Review**, 38 (1) 91-96, 2015.

NASH, J.G.; VOSS, J.L.; SQUIRES, E.L. Urination during ejaculation in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 176, 224-227, 1980.

NAYLOR, J.M.; NICKEL, D.D.; TRIMINO, G.; CARD, C.; LIGHTFOOT, K.; ADAMS, G. Hyperkalaemic periodic paralysis in homozygous and heterozygous horses: a co-dominant genetic condition. **Equine Veterinary Journal**, 31 (2) 153-159, 1999.

NEELY, D.P.; BRAVO, P.W. Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In: YOUNGQUIST, R.S. (Ed.), **Current Therapy in Large Animal**. Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 1997.

NICOLAS, M.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; MARTINEZ, F.; BORRAGAN, S.; MARTINEZ-PASTOR, F.; PAZ, P. de; ANEL, L. Spermatozoa recovery and post-thawing quality of brown bear ejaculates is affected for centrifugation regimes. **European Journal of Wildlife Research**, 58, 77-84, 2012.

NICOLAS, M.; ALVAREZ, M.; BORRAGAN, S.; MARTINEZ-PASTOR, F.; CHAMORRO, C.A.; ALVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; PAZ, P. de; ANEL, L. Evaluation of the qualitative and

quantitative effectiveness of three media of centrifugation (Maxifreeze, "cushion" Fluid Equine, and PureSperm[®] 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. **Theriogenology**, 77, 1119-1128, 2012b.

NICOLAS, M.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; MATA-CAMPUZANO, M.; BORRAGAN, S.; MARTINEZ-PASTOR, F.; PAZ, P de. Effects on brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa freezability of different extender and dilution ratios used for pre-freezing centrifugation. **European Journal of Wildlife Research**, 57, 259-266, 2011.

O'BRIEN, J.K.; ROTH, T.L.; STOOPS, M.A.; BALL, R.L.; STEINMAN, K.L.; MONTANO, G.A.; LOVE, C.C.; ROBECK, T.R. Sperm sex-sorting and preservation for managing the sexratio and genetic diversity of the southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). **Animal Reproduction Science**, 152, 137-153, 2015.

OKANO, T.; MURASE, T.; TSUBOTA, T. Electro-ejaculation and sêmen cryopreservation of free-ranging Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Journal of Veterinary Medicine Science**, 66, 1371-1376, 2004.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MURIEL, A.; MACÍAS-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ALONSO, J.M.; PENA, F.J. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of stallion sperm? **Reproduction in Domestic Animals**, 44, 518-522, 2009.

POMMER, A.C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. **Theriogenology**, 58, 1373-1384, 2002.

ROTH, T.L.; STOOPS, M.A.; ATKINSON, M.W.; BLUMER, E.S.; CAMPBELL, M.K.; CAMERON, K.N.; CITINO, S.B.; MAAS, A.K. sêmen collection in rhinoceroses (*Rhinoceros unicornis*, *Diceros bicornis*, *Ceratotherium simum*) by electro-ejaculation with a uniquely designed probe. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, 36, 617-627, 2005.

SANTOS, I.P.; CUHNA, I.C.P.; MELO, E.T.J. Effects of urine and NaCl solutions of different osmolarities on canine sperm. **Animal Reproduction**, 8, 73-79, 2011.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINEIA, V.H.; LOPES, M.D.; SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed sêmen parameters on *in vitro* sperm-oocyte interactions. **Theriogenology**, 66, 456-462, 2006.

SÖDERLUND, B.; LUNDIN, K. The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. **Human Reproduction**, 15, 857-860, 2000.

TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallion. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, 41, 329-335, 1974.

TURNER, R.M.O. Urospermia and hemospermia. In: MCKINNON, A.O.; PYCOCK, J.F.; SAMPER, J.C. (Eds.), **Current therapy in equine reproduction**, Saunders, St. Louis, 2007.

TURNER, R.M.O.; LOVE, C.C.; MCDONNELL, S.M.; SWEENEY, R.W.; TWITCHELL, E.D.; HABECKER, P.L.; REILLY, L.K.; POZOR, M.A.; KENNEY, R.M. Use of imipramine hydrochloride for treatment of urospermia in a stallion with a dysfunctional bladder. **Journal of American Veterinary Medical Association**, 207, 1602-1606, 1995.

TUTKO, J.M.; SELTON, D.C.; BURNS, G.A.; VIVRETTE, S.L.; RAGLE, C.A.; MCCONNICO, R.S.; GIBBONS, D. Cranial coccygeal vertebral fractures in horses: 12 cases. *Equine Veterinary Education*, 14, 197-200, 2002.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; TAYLOR, T.S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. **Animal Reproduction Science**, 60-61:493-509, 2000.

VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.B.; CARROL, B.S.; ESLICK, M.C. sêmen processing for the subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, 28, 677-685, 2008.

VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. **Diseases and management of breeding stallions**. Goleta, California: American Veterinary Publications, 337-340, 1991.

VERSTEGEN, J; IGUER-OUADA, M; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, 2002.

VOGE, J.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MESCHINI, M.; TURNER, C.; TEAGUE, S.R.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C. The effects of urine concentration, and "cushion" centrifugation to remove urine, on the quality of cool-stored stallion sperm. **Theriogenology**, 86 (5) 1294-1298, 2016.

VOLPE, A.; ARTINI, P.G.; COUKOS, G.; UCCELI, E.; MARCHINI, E.; GENAZZANI, A.R. Sperm retrieval for direct intraperitoneal insemination in a diabetic with retrograde ejaculation. **Journal of Reproductive Medicine**, 37, 219-220, 1992.

VOSS, J.L.; McKINNON, A.O. Hemospermia and urospermia. In: McCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (eds). **Equine Reproduction** (Lea and Febiger) Philadelphia-PA. 1993.

WAITE, J.A.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; TEAGUE, S.R.; SALAZAR, J.L.; MANCILL, S.S. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following "cushioned" centrifugation. **Theriogenology**, 70, 704-714, 2008.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981.

ANEXO

PUBLICAÇÕES FORA DA ÁREA DA TESE – 1

pH from mammary gland secretions is acidic at the time of parturition but remains neutral during the first week postpartum in mares

G. Amorim, I.F. Canisso, R.E. Ellerbrock, J. Honorato Pinto, Jr., F. S. Lima, M. Baldes, K. Kline
College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana IL

Serial assessment of pH from mammary gland secretions is an inexpensive and reliable method to determine impending parturition in mares. Most mares carrying normal pregnancies foal with a secretion pH of 6.2-6.6, and electrolyte concentrations and pH are significantly correlated. However, previous studies have demonstrated that some mares foal before showing a drop in pH and increase in calcium, and it is unclear if these mares show these changes at the time of parturition. Additionally, mammary gland secretion pH could change minutes after collection due to changes in temperature, increase in bacteria, and oxygenation. The objectives of this study were: (i) to determine pH and electrolyte concentrations from mammary gland secretions collected prepartum and at the time of parturition, (ii) to characterize milk pH in the first week postpartum, and (iii) to evaluate pre-foaling mammary secretions pH at three storage temperatures. We hypothesized that (i) mammary gland secretions present an acidic pH, increased calcium, magnesium, and potassium and decreased sodium at time of foaling, regardless of prepartum pH and electrolyte concentrations, and (ii) pre-foaling secretion pH varies with storage temperature and time in an initial value dependent manner. Light breed mares (n=25) carrying normal pregnancies presented for foaling management were examined daily for signs of impending parturition, and small aliquots (0.5-2 mL) of pre-foaling mammary gland secretions were collected twice a day until foaling. Secretion pH was measured with a portable pH meter (Compact pH METER B-71X, HORIBA Scientific, LAQUAtwin, Japan), and aliquots were preserved at -20°C for electrolyte evaluation. Calcium (Ca²⁺), sodium (Na⁺), potassium (K⁺) and magnesium (Mg²⁺) concentrations were measured using an automated Analyzer (AU 480 Beckman Coulter, CH 1260 Nyon, Switzerland) for the seven days pre-foaling. Eighteen 5ml aliquots were harvested to determine the effect of temperature and time on secretion pH. Samples were divided into three groups based on pH: 8 (range 7.8-8.2), 7.5 (range 7.3-7.7), 7 (6.7-7.2), and 6.5 (6.2-6.6). Immediately after collection, samples were equally divided into three storage conditions: 37°C, 21°C, and 5°C. Secretion pH was measured at 0, 15, 30, 45 and 60 min, and then repeated hourly for 10 h after collection. Milk samples were collected from all mares to evaluate pH once daily for seven days after parturition. All data analyses used JMP 12.1 (SAS Institute Cary, NC, USA). Concentrations of electrolytes and pH were analysed using mixed models for seven days pre-foaling. When significant, post hoc comparisons were made with Tukey's LSD test. Two ways interactions were examined between fixed and continuous effects in the different models. Results of milk pH for the first week postpartum were compared with a mixed model. The significance is set as p ≤ 0.05. All the data are expressed as mean ± SEM. All mares had high Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, and low Na⁺ at the time of parturition. All three mares with an alkaline pH up until parturition had an acidic pH at the time of foaling. The pH of mammary gland secretions was slightly acidic (6.8-6.9) the first two days postpartum, but became neutral (7-7.1) for the next five days. Storage temperature of mammary gland secretions did not significantly affect pH up to 45 minutes of storage. Longer storage did result in significant variation in pH. In conclusion, mares with an alkaline pH, low Ca²⁺, and high Na⁺, did change pH and electrolyte profile before foaling but changed so rapidly that twice a day sampling may miss the change. Mare milk pH became neutral by three days postpartum. Storage temperature of mammary gland secretions did not affect pH for 45 min.

Keywords: Foaling, horses, mammary gland secretions storage

ANEXO (cont.)

PUBLICAÇÕES FORA DA ÁREA DA TESE – 2

Enrofloxacin and its active metabolite (ciprofloxacin) cross the equine placenta and do not cause lesions in the fetal articular surface and growth plates

R.E. Ellerbrock,^a I.F. Canisso,^a L.T. Rothrock,^a P.J. Roady,^b J. Honorato,^a P.A. Wilkins,^b L. Dirikolu,^c F.S. Lima^a

^aDepartment of Veterinary Clinical Medicine; ^bVeterinary Diagnostic Laboratory; ^cDepartment of Comparative Biosciences, College of Veterinary Medicine, University of Illinois, Urbana IL

Antimicrobial therapy is used in broodmare practice to treat a variety of bacterial diseases including pneumonia, septic arthritis, osteomyelitis, enterocolitis, and placentitis. Unfortunately, evolving microbial resistance to commonly used antimicrobials has decreased the number of affordable and reliable antibiotics available to treat these infections. Enrofloxacin, a fluoroquinolone antimicrobial with bactericidal activity against both gram-negative and gram-positive pathogens, would be an excellent therapeutic option for bacterial infections in pregnant mares if proven safe. There is currently no evidence that enrofloxacin crosses the equine placenta and therapeutic use is largely avoided in pregnant mares as it is assumed that enrofloxacin is toxic to the fetus based on limited *in vitro* and foal studies. We hypothesized that enrofloxacin and its active metabolite (ciprofloxacin) cross the equine placenta without production of cartilaginous lesions in fetuses. The objectives of this study were to determine enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in the maternal and fetal plasma and fetal fluids when enrofloxacin is administered at therapeutic doses during late-term pregnancy, and to evaluate the articular cartilage of the long bones of fetuses from those mares. Mares carrying normal pregnancies (~280d of gestation) were assigned to: 1) control (n=3), 2) therapeutic dose of enrofloxacin (n= 6, 5mg/kg), and 3) double therapeutic dose enrofloxacin (n=6, 10mg/kg). Enrofloxacin was administered intravenously every 24h for 10d. Maternal plasma samples were collected daily for 11d and plasma preserved at -80°C. Transabdominal ultrasound guided fetal fluid sampling was performed at days 1, 5 and 11. Premature delivery was induced by manual dilation of the cervix and serial doses of oxytocin. At delivery, fetal plasma was collected and similarly preserved. Enrofloxacin and ciprofloxacin were measured by LS-MS/MS. Proximal articular surfaces of humerus, radius, femur, and tibia were examined macroscopically and histologically. Statistical analysis was performed using ANOVA with repeated measures and significance was considered when $p < 0.05$. Enrofloxacin and ciprofloxacin reached minimal inhibitory concentrations for common equine pathogens in all examined fluids. Ciprofloxacin did not significantly increase with the double pharmacological enrofloxacin dose in maternal plasma, but allantoic fluid showed a 10-20 fold increase relative to maternal and fetal plasma concentrations. No macroscopic, cytological, or extracellular matrix lesions were found in the fetal cartilage from enrofloxacin-treated mares. These findings support our hypothesis that enrofloxacin and its metabolite cross the equine placenta and do not induce cartilaginous lesions in the fetus at recommended doses in late pregnant mares. Additional studies are warranted to confirm our findings of lack of fetal injury.

Keywords: Fetal toxicity, late-term pregnancy, fluoroquinolone

Acknowledgements: USDA Hatch funds for Animal Health and Department of Veterinary Clinical Medicine, University of Illinois Urbana-Champaign.

ANEXO (cont.)

PUBLICAÇÕES FORA DA ÁREA DA TESE - 3

Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite (ciprofloxacin) in late-term pregnant and post-parturient mares – preliminary results

B. Curcio,^{a,b} S.Giguère,^c Z. Li,^a J. Honorato,^a R. Ellerbrock,^a F.S. Lima,^a P.A. Wilkins,^a I.F. Canisso^a
^aUniversity of Illinois Urbana-Champaign, Urbana IL; ^bUniversidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil; ^cUniversity of Georgia, Athens, GA

Antimicrobial therapy is necessary to treat severe bacterial diseases, and ongoing studies in our laboratory suggest that enrofloxacin, a fluoroquinolone antimicrobial with bactericidal activity against gram-negative and some gram-positive pathogens, is an alternative antimicrobial for infections in pregnant mares. Pregnancy induces changes including increases in plasma volume, total body water, renal blood flow, delayed gastric emptying, and hormone-induced changes in hepatic microsomal enzyme activity, resulting in alteration of bioavailability, distribution, metabolism, and excretion of drugs. The changes may necessitate doses and dosing interval adjustments during pregnancy. The objective of this study was to determine the pharmacokinetics of enrofloxacin, administered orally and intravenously, to pregnant and non-pregnant mares using a cross-over design. We hypothesized that the pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite (ciprofloxacin) in late-term pregnant mares differ from those of non-pregnant mares. Four light breed, healthy pregnant mares (260 d gestation, n=4) were randomly treated with a single dose of either intravenous (5mg/kg, IV) or oral (7.5mg/kg, PO) enrofloxacin; the other route was given 7d later with both treatments repeated by 45 d postpartum. Plasma samples were obtained at 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90 min, and 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 and 72 h after enrofloxacin administration (IV or PO). Concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin were measured by LC-MS/MS. Plasma enrofloxacin and ciprofloxacin concentration vs. time were analyzed for each mare based on noncompartmental pharmacokinetics. Normality of the data was assessed using histograms of differences in means, normal quantiles plots of the residuals and the Shapiro-Wilk test. Constant variance of the data was assessed with Levene's test. Comparison of each pharmacokinetic variable between pregnant (PG) and postpartum mares (PP) was done with the paired t test or the Wilcoxon signed rank test ($p \leq 0.05$). After IV administration, apparent volume of distribution and systemic clearance of enrofloxacin were significantly lower in PG than PP mares. For both routes (IV and PO), enrofloxacin showed greater area under the curve concentration vs. time curve ($AUC_{0-\infty}$) and plasma concentration 24h after administration (C_{24h}) in PG mares than PP mares: IV $AUC_{0-\infty}$ 18.3 ± 1.9 (PG) vs 12.8 ± 2.1 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$ (PP), $p=0.03$ and IV C_{24h} 0.106 ± 0.035 (PG) vs. 0.032 ± 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PP), $p=0.03$; PO $AUC_{0-\infty}$ 17.7 ± 4.5 vs 8.2 ± 1.6 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$, $p=0.03$ and PO C_{24h} 0.171 ± 0.078 vs. 0.047 ± 0.015 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p=0.049$. The ciprofloxacin $AUC_{0-\infty}$ and C_{24h} were larger in late gestation than postpartum period after IV administration, respectively IV $AUC_{0-\infty}$ 3.0 ± 0.7 vs 1.8 ± 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$, $p=0.016$ and IV C_{24h} 0.036 ± 0.04 vs 0.013 ± 0.002 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $p=0.019$. Time to maximum plasma concentration, half life of the terminal phase and oral bioavailability were not significantly different between the groups for all treatments. In conclusion, pregnancy significantly affected the pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin.

Keywords: Enrofloxacin, ciprofloxacin, pregnancy, mare

Acknowledgments

USDA Hatch funds & CAPES (B.R.C. Brazil #99999.005570/2015-08).

ANEXO (cont.)

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS - 1

CERTIFICATE OF ATTENDANCE



Jailson Honorato

Attended the

7th International Symposium on Stallion Reproduction

Urbana-Champaign, Illinois, USA

August 27-29, 2016

Attendance at ISSR provided 18 hours of continuing education credit.

Lawrence D. Firkins
Associate Dean
Office of Public Engagement



ANEXO (cont.)

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS - 2

