

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**TÉCNICAS REPRODUTIVAS EM RUMINANTES E EQUINOS 1: AVALIAÇÃO E
PROCESSAMENTO DE SÉMEN: APLICAÇÃO PRÁTICA (3 ECTS)**

**SUMÁRIO DA LIÇÃO: RECOLHA E PROCESSAMENTO DE SÉMEN NO
GARANHÃO**

Elisa Maria Varela Bettencourt

Departamento de Medicina Veterinária

Elaborado como requisito parcial para a prestação de provas públicas de agregação, conforme o artigo 8º e na alínea c) do artigo 5º, do Decreto-Lei n.º 239/2007 de 19 de junho publicado no Diário da República I série – N.º 116 – 19 de junho de 2007.

1. Introdução

Sendo esta UC predominantemente teórico-prática, optou-se por nesta aula de enquadramento reunir as várias introduções teóricas associadas às aulas de recolha e processamento de sémen no garranhão. Nesta aula serão abordados conceitos específicos relativos à recolha e avaliação seminal no garranhão, bem como as bases do processamento de sémen, refrigeração, congelação e processamento de sémen em garranhões maus refrigeradores/congeladores, correspondendo aos temas 6, 7 e 8 do programa da Unidade Curricular.

2. Resumo do conteúdo da aula

Exame do garranhão: recolha e avaliação de sémen

Será abordado o exame do garranhão incluindo exame clínico de estado geral, avaliação da genitália externa, avaliação do diâmetro testicular, avaliação da libido e espermograma (Hernández-avilés & Love, 2021; Varner, 2016).

No que concerne a recolha de sémen indicar-se-ão as técnicas de recolha e regras de segurança associadas (J. Dascanio & McCue, 2021; Alvarenga et al., 2016; McDonnell, 2016). Em relação à avaliação seminal serão abordadas as diferentes metodologias, utilizadas em diferentes laboratórios, suas vantagens e inconvenientes, bem como a sua correlação com a fertilidade (Prell et al., 2020; Whitesell et al., 2020; Kareskoski et al., 2019; Charles C. Love, 2016; Sieme et al., 2004). Serão referidas quer as técnicas de rotina quer as técnicas de avaliação mais objetivas, como a citometria de fluxo e o sistema computadorizado de avaliação de sémen (CASA) (Hernández-Avilés et al., 2019; Barrier Battut et al., 2016; Battut et al., 2017; C.C. Love, 2016; C. C. Love, 2011).

Refrigeração de sémen

Nesta componente serão referidas as vantagens e desvantagens da aplicação de sémen refrigerado, e a sua aplicabilidade prática (C. Aurich, 2008; C. Aurich, 2005). No que concerne ao processamento serão indicadas as bases teóricas de todo o processamento, nomeadamente no que concerne à escolha do diluidor e fator de diluição (Rečková et al., 2022; Bradecamp, 2021; Papin et al., 2021; Batellier et al., 2001; P. R. Loomis & Graham, 2008; Paul R. Loomis, 2006), procedimentos associados à centrifugação (Papin et al., 2021) e vantagens e desvantagens da centrifugação (J M Morrell & Rocha, 2022; Gibb & Aitken, 2016; Barrier-Battut et al., 2013; C C Love et al., 2002). Igualmente, será abordado o processo de arrefecimento, transporte e conservação do sémen refrigerado (Cuervo-Arango et al., 2015; Katila, 2011; Brinsko S.P., Rowan K.R., Varner D.D. & T.L., 2000).

Criopreservação de sémen no garanhão

Serão abordadas as principais alterações associadas ao processo de criopreservação no sémen de garanhão bem como os métodos suscetíveis de minimizar as lesões associadas ao processo (J. Aurich et al., 2020; Atroshchenko et al., 2019; Šichtař et al., 2019; Al-Essawe et al., 2018; Alvarenga et al., 2016). Existindo grande variabilidade individual na resistência ao processo de criopreservação serão apontados e analisados os vários fatores que condicionam essa variabilidade como a idade, sazonalidade, raça (Aurich et al., 2020; Greiser et al., 2020; Jiménez-Rabadán et al., 2016; Loomis & Graham, 2008; C C Love et al., 2002; P. R. Loomis, 2001).

No que concerne o procedimento da criopreservação, serão referidos os principais componentes dos diluidores, sua função ((Šichtař et al., 2019; Batellier et al., 2001 Álvarez et al., 2014); velocidade de arrefecimento e método de criopreservação (McCue, 2021; Nikitkina et al., 2020; Alvarenga et al., 2016). Torna-se também importante de reforçar os métodos de avaliar a eficácia de cada protocolo de criopreservação e qual a sua relação com a fertilidade do mesmo após aplicação (McCue, 2021; Hernández-Avilés et al., 2019; Battut et al., 2017; Charles C. Love, 2016; Peña et al., 2016; Varner, 2016; Vidament et al., 2005).

Processamento de sémen de garanhões maus refrigeradores/congeladores

Na seleção na espécie equina, os critérios não incluem, na maioria das raças, os caracteres reprodutivos (Al-Essawe et al., 2018). Assim, apenas 20% dos garanhões resistem bem à criopreservação e cerca de 20-50% dos garanhões produzem sémen que resiste mal aos processos de arrefecimento e criopreservação (Vidament et al., 1997). Existe grande variabilidade na sensibilidade ao processo não só entre garanhões, mas também entre ejaculados do mesmo garanhão (Loomis & Graham, 2008).

Serão abordadas as várias metodologias disponíveis, passíveis de serem utilizadas na melhoria da qualidade do sémen pré e pós refrigeração/congelação. Serão referidos os diferentes processos de centrifugação bem como, os diferentes métodos de seleção dos espermatozoides, baseados nas suas características, nomeadamente a motilidade (migração ou swimming up), a integridade de membrana (filtração) e a motilidade, morfologia, viabilidade e integridade da cromatina (centrifugação com coloide) (Al-Kass et al., 2021; Papin et al., 2021; Šichtař et al., 2019; Hidalgo et al., 2017; Morrell & Rodriguez-Martinez, 2011). Será igualmente referida a adição de diferentes componentes ao sémen, nomeadamente frações do plasma seminal, proteínas do plasma seminal, antioxidantes, com o objetivo de aumentar a resistência ao processo de criopreservação, podendo ser aplicada isolada ou associada a outras técnicas (Contreras et al., 2020; Šichtař et al., 2019; Al-Essawe et al., 2018).

3. Bibliografia

- Al-Essawe, E., Johannisson, A., Wulf, M., Aurich, C., & Morrell, J. (2018). Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*, 81(July 2017), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.01.009>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., & Ramires Neto, C. (2016). Advances in Stallion Semen Cryopreservation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 521–530. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.003>
- Álvarez, C., Gil, L., González, N., Olaciregui, M., & Luño, V. (2014). Cryobiology Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96 Ò extender q. *Cryobiology*, 69(1), 144–148. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.06.008>
- Atroshchenko, M. M., Bragina, E. E., Zaitsev, A. M., Kalashnikov, V. V., Naumenkova, V. A., Kudlaeva, A. M., & Nikitkina, E. V. (2019). Conservation of genetic resources in horse breeding and major structural damages of sperm during semen cryopreservation in stallions. *Nature Conservation Research*, 4, 78–82. <https://doi.org/10.24189/ncr.2019.024>
- Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025>
- Aurich, C. (2008). *Recent advances in cooled-semen technology* & 107, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015>
- Aurich, J., Kuhl, J., Tichy, A., & Aurich, C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in stallions. *Animals*, 10(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10061033>
- Barrier-Battut, I., Bonnet, C., Giraudo, A., Dubois, C., Caillaud, M., & Vidament, M. (2013). Removal of Seminal Plasma Enhances Membrane Stability on Fresh and Cooled Stallion Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(1), 64–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02026.x>
- Barrier Battut, I., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S., & Chevrier, L. (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4), 1111–1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.001>
- Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J. M., & Magistrini, M. (2001). Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
- Bliss, S. B., Voge, J. L., Hayden, S. S., Teague, S. R., Brinsko, S. P., Love, C. C., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2012). The impact of cushioned centrifugation protocols on semen quality of stallions. *THE*, 77(6), 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.031>
- Bradecamp, E. A. (2021a). Centrifugation of Semen: Standard Technique. In *Equine Reproductive Procedures* (pp. 551–556).
- Bradecamp, E. A. (2021b). Packing Semen for Cooled Transport. In John Wiley & Sons (Ed.), *Equine Reproductive Procedures* (pp. 541–546). <https://doi.org/10.1002/9781119556015.ch146>
- Brinsko S.P., Rowan K.R., Varner D.D., B., & T.L. (2000). Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 53(8), 1641–1655.
- Bubenickova, F., Postlerova, P., Simonik, O., Sirohi, J., & Sichtar, J. (2020). Effect of seminal plasma protein fractions on stallion sperm cryopreservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21176415>
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>

- Contreras, M. J., Treulen, F., Arias, M. E., Silva, M., Fuentes, F., Cabrera, P., & Felmer, R. (2020). Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(2), 229–239. <https://doi.org/10.1111/rda.13611>
- Crabtree, J. (2010). Prebreeding examination of the stallion 1. Physical examination. *In Practice*, 32(1), 22–28. <https://doi.org/10.1136/inp.b5503>
- Dascanio, J. J., & McCue, P. M. (2014). Equine Reproductive Procedures. In *Equine Reproductive Procedures*. <https://doi.org/10.1002/9781118904398>
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S29–S36. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006>
- Guimarães, T., Lopes, G., Pinto, M., Silva, E., Miranda, C., Correia, M. J., Damásio, L., Thompson, G., & Rocha, A. (2015). Colloid centrifugation of fresh stallion semen before cryopreservation decreased microorganism load of frozen-thawed semen without affecting seminal kinetics. *Theriogenology*, 83(2), 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.003>
- Hernandez-Aviles, C., & Love, C. (2021). Prebreeding season/prepurchase examination of the stallion: testicular ultrasonography, semen evaluation and considerations. *Clinical Theriogenology*, 13(289), 289–298.
- Hernández-Avilés, C., Zambrano-Varón, J., & Jiménez-Escobar, C. (2019). Current trends on stallion semen evaluation: What other methods can be used to improve our capacity for semen assesement? *Journal of Veterinary Andrology*, 4(1), 1–19.
- Hidalgo, M., Ortiz, I., Dorado, J., Morrell, J. M., Gosálvez, J., Consuegra, C., Diaz-Jimenez, M., Pereira, B., & Crespo, F. (2017). Stallion sperm selection prior to freezing using a modified colloid swim-up procedure without centrifugation. *Animal Reproduction Science*, 185(June), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.005>
- Katila, T. (2011). Containers for transport of equine semen. In AO. McKinnon, EL. Squires, WE. Vaala, & DD. Varner (Eds.) (Ed.), *EQUINE REPRODUCTION* (2nd ed., pp. 1330–1335). WILEY-BLACKWELL.
- Loomis, P. R. (2001). The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 191–200. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00156-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00156-7)
- Loomis, P. R., & Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, 105(1–2), 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.010>
- Loomis, Paul R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 22(3), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.002>
- Love, C. C. (2011). Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76(3), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.007>
- Love, C C, Thompson, J. A., Lowry, V. K., & Varner, D. D. (2002). *Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility*. 57, 1135–1142.
- Love, Charles C. (2016). Modern Techniques for Semen Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 531–546. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.006>
- McCue, P. M. (2021). Semen Freezing. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Equine Reproductive Procedures* (pp. 567–571).
- McDonnell, S. M. (2016). Advances in Diagnostics and Therapeutic Techniques in Breeding Behavior Disorders in Stallions. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(3), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.07.008>
- Morrell, J. M., & Rodriguez-Martinez, H. (2011). Practical applications of sperm selection techniques as a tool for improving reproductive efficiency. *Veterinary Medicine International*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/894767>
- Morrell, J M, & Rocha, A. (2022). *A Novel Approach to Minimising Acute Equine Endometritis That May Help to Prevent the Development of the Chronic State*. 8(January), 1–11.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.799619>

- Nikitkina, E., Musidray, A., Krutikova, A., Anipchenko, P., Plemyashov, K., & Shiryaev, G. (2020). Cryopreservation in Stallions. *Animals*, 10(10), 1801.
- OIE. (2019). *Terrestrial animal health code: General provisions* (Vol. 1).
- Ortega-Ferrusola, C., Gracia-Calvo, L. A., Ezquerro, J., & Pena, F. J. (2014). Use of colour and spectral doppler ultrasonography in stallion andrology. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(s4), 88–96. <https://doi.org/10.1111/rda.12363>
- Prell, M. J., McCue, P. M., Moffett, P. D., & Graham, J. K. (2020). Motility and Fertility Evaluation of Thawed Frozen Stallion Semen After 24 Hours of Cooled Storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, 90, 102983. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.102983>
- Rečková, Z., Filipčík, R., Soušková, K., Kopecký, T., Hošek, M., & Pešan, V. (2022). The efficiency of different types of extenders for semen cooling in stallions. *Animal Bioscience*, 35(5), 670–676. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0300>
- Roach, J., Schnobrich, M., Ellerbrock, R., Feijo, L., Bradecamp, E., Alvarenga, M. A., Kline, K., & Canisso, I. (2016). Paper Comparison of cushioned centrifugation and SpermFilter filtration on longevity and morphology of cooled-stored equine semen. <https://doi.org/10.1136/vr.103607>
- Šichtař, J., Bubeníčková, F., Sirohi, J., & Šimoník, O. (2019). How to increase post-thaw semen quality in poor freezing stallions: Preliminary results of the promising role of seminal plasma added after thawing. *Animals*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/ani9070414>
- Sieme, H., Bonk, A., Hamann, H., Klug, E., & Katila, T. (2004). Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. *Theriogenology*, 62(5), 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.011>
- Varner, D. D. (2016). Approaches to Breeding Soundness Examination and Interpretation of Results. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43, S37–S44. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.075>
- Vidament, M., Dupere, A. M., Julienne, P., Evain, A., Noue, P., & Palmer, E. (1997). Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. *Theriogenology*, 48(6), 907–917. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00319-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00319-1)
- Watson, P. F. (2000). *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen*. 481–492.
- Whitesell, K., Stefanovski, D., McDonnell, S., & Turner, R. (2020). Evaluation of the effect of laboratory methods on semen analysis and breeding soundness examination (BSE) classification in stallions. *Theriogenology*, 142, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.09.035>
- Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-Melkus, E., Jung, M., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*, May, 106822. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246(December 2021), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Yeste, M., Estrada, E., Rocha, L. G., Marín, H., Rodríguez-Gil, J. E., & Miró, J. (2015). Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. *Andrology*, 3(2), 395–407. <https://doi.org/10.1111/andr.291>