

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**NOVOS PROTOCOLOS UTILIZANDO ASSOCIAÇÕES COM
OCITOCINA NA INDUÇÃO FARMACOLÓGICA DA EJACULAÇÃO
EM GARANHÕES**

Thaís Mendes Sanches Cavalero

BOTUCATU- SÃO PAULO
Setembro/2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**NOVOS PROTOCOLOS UTILIZANDO ASSOCIAÇÕES COM
OCITOCINA NA INDUÇÃO FARMACOLÓGICA DA EJACULAÇÃO
EM GARANHÕES**

THAÍS MENDES SANCHES CAVALERO

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU- SÃO PAULO

Setembro/2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cavalero, Thais Mendes Sanches.

Novos protocolos utilizando associações com ocitocina na indução farmacológica da ejaculação em garanhões / Thais Mendes Sanches Cavalero. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504037

1. Ejaculação - Distúrbios. 2. Imipramina. 3. Sêmen. 4. Xilazina. 5. Ocitocina. 6. Equino. 7. Sedativos.

Palavras-chave: detomidina; distúrbios ejaculatórios; imipramina; sêmen; xilazina.

Nome do autor (a): Thaís Mendes Sanches Cavaleiro

Título: NOVOS PROTOCOLOS UTILIZANDO ASSOCIAÇÕES COM OCITOCINA NA INDUÇÃO FARMACOLÓGICA DA EJACULAÇÃO EM GARANHÕES.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Medicina Veterinária da UFMG, campus Pampulha - Belo Horizonte /MG

Data da Defesa: 20 de setembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Tadeu e Wilma, minhas maiores fontes de orgulho, motivação e inspiração. Amo vocês.

“Enquanto houver vocês do outro lado, aqui do outro eu consigo me orientar.. “

O teatro mágico - O anjo mais velho

Ao meu querido avô, Joaquim Vieira Mendes (*in memoriam*), que sempre fez tanto por mim ao longo de sua vida. Sei que onde o senhor estiver, está olhando por nós com a sua serenidade, paciência e compressão. Sempre será lembrado como um grande exemplo de humildade, honestidade, caráter, inteligência, educação e fé. Saudade eterna.

“O valor de um homem não se dá pelas roupas ou bens que possuí, mas sim pelo caráter e beleza de seus ideais.”

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por sempre guiar meus passos e por me agraciar com uma família tão abençoada.

Aos meus pais, meu porto seguro, por confiarem na minha capacidade, por todo o esforço e por me proporcionarem essa estrutura familiar sólida que me ofereceu todas as condições para que eu finalizasse mais uma etapa da minha vida.

A minha irmã, e aos meus primos, eternas crianças, Andréa, Vinícius e Douglas.

As minhas tias, e psicólogas particulares, Delza e Virgínia, por todo o cuidado e carinho, sempre me apoiando mesmo à distância.

Ao meu avô, Moacir Cavaleiro, por ter me levado para o sítio durante todas as minhas férias da escola, por ter me ensinado a andar a cavalo, por ter sido meu treinador nas provas dos três tambores, seis balizas e laço em dupla, por ter sido meu companheiro de cavalgadas, abertura de rodeios e provas, enfim, por ter sido tão presente na minha infância e adolescência, compartilhando comigo essa paixão pelos cavalos.

As minhas avós, Belmira e Lígia, pelo amor, carinho, preocupação e paciência. E também por todas as orações e torcidas em cada etapa da minha trajetória.

Ao meu orientador, Prof. Papa, por acreditar no meu potencial e me oferecer essa oportunidade, por me apoiar mesmo sabendo das dificuldades de desenvolver este trabalho e por me ensinar tudo o que sei sobre Andrologia Equina. Agradeço imensamente pela oportunidade de aprender e trabalhar naquilo que há alguns anos era apenas um sonho distante.

Aos meus amigos de longa data, da infância e da faculdade, por se fazerem presentes em minha vida e entenderem minha ausência.

Aos amigos que fiz em Botucatu, em especial a essa guria bagual, Rúbia, por ter me ajudado durante todas as etapas desse longo trabalho, pelas madrugadas na faculdade, pelas viagens para coleta de dados, pelo apoio, companheirismo e amizade durante esses três anos.

Aos amigos, Edjalma, meu ex colega de equipe e grande incentivador do desenvolvimento desse projeto, Laíza, pelo companheirismo em todos os

momentos, até mesmo nas madrugadas macerando comprimidos ou naquelas degustando vinhos e Priscilla, por todo o auxílio, incentivo, troca de ideias e companheirismo.

A equipe de pós-graduandos do CERAN, pela convivência diária, por toda a ajuda, troca de experiências, e também pelos momentos compartilhados durante os experimentos, organizando cursos e participando de eventos.

Aos que me acolheram em Botucatu durante meu período de estágio em 2013, e ainda hoje contribuem para meu crescimento profissional, Gabriel Monteiro e Yamê Fabres.

Ao Médico Veterinário Humberto, e a Central Equus de Reprodução Equina, por abrirem as portas da Central, confiarem em mim e permitirem a utilização dos ganhões para o desenvolvimento do meu trabalho. Agradeço também aos estagiários, residentes e funcionários da Central, pela proatividade e ajuda em tudo o que precisei.

A Camila Dell’Aqua pelo auxílio, compreensão e pelos vários encaixes nos horários das análises de citometria de fluxo.

Aos meus colegas de residência, os quais considero amigos e guardo boas lembranças, Vivi, Lucas, Zero, Gabi e Rafaela.

Aos residentes e ex residentes de 2017 e 2018 por sempre estarem dispostos a me ajudar em tudo o que precisei durante o desenvolvimento deste experimento.

As funcionárias, Dona Raquel e Lurdinha, por serem compreensivas e não me expulsarem do CERAN às quintas-feiras durante a limpeza do laboratório, por todas as brincadeiras e conversas, pelo carinho e pela compreensão.

Aos funcionários Edilson, Edvaldo, Felipe e Evandro, pelo auxílio durante o desenvolvimento do experimento.

Ao Billy, por ser meu fiel companheiro em Botucatu, tornando minha casa mais “peluda”, meus dias mais barulhentos e minhas noites mais alegres.

A Universidade Federal de Uberlândia, instituição onde me graduei, por ter me aberto as portas e realizado meu sonho de ser Médica Veterinária. Agradeço também ao Prof. Robson Antunes, meu orientador de TCC e

iniciação científica, por ter me apresentado ao ambiente acadêmico e a pesquisa científica.

À UNESP, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os professores por terem contribuído com o meu crescimento profissional e pessoal, pela troca de experiências e convivência diária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedidos para a realização desse projeto de pesquisa.

“A educação é o que sobra depois que nos esquecemos do que aprendemos na escola.”

Albert Einstein

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Table 01. Settings for stallion semen analyses	69
Table 02. Summary of pharmacological induced ex copula protocols and ejaculation rates of 12 sexually mature stallions in 2 trials of each stallion in each protocol.....	71
Table 03. Mean values and standard deviation of seminal characteristics of base line in copula and pharmacologically-induced ex copula ejaculates of 9 stallions. Values were calculated from the mean of 2 ejaculates from each stallion (except 3 stallions that had only 1 induced ejaculate).....	72

Lista de Figuras

Capítulo 1

FIGURA 1 - Corte transversal do corpo do pênis. a) artéria dorsal do pênis, b) veia dorsal do pênis, c) nervo dorsal do pênis, d) túnica albugínea, e) corpo cavernoso do pênis, f) trabéculas, g) uretra, h) músculo bulboesponjoso, i) músculo retrator do pênis, j) corpo esponjoso do pênis. (arquivo pessoal) 22

FIGURA 2 - Corte lateral de pênis e prepúcio. a) plexo venoso dorsal, b) corpo cavernoso do pênis, c) uretra, d) corpo esponjoso do pênis, e) prega prepucial, f) orifício prepucial, g) processo uretral, h) fossa da glândula, i) sinus uretral, j) coroa da glândula, l) parede abdominal. (arquivo pessoal) 22

FIGURA 3 - O aumento do fotoperíodo diminui a melatonina circulante, reduzindo o feed back negativo ao hipotálamo, que aumenta a produção e liberação de GnRH. Este hormônio atua na adenohipófise estimulando a liberação dos hormônios FSH e LH. O FSH atua nas células de Sertoli induzindo a síntese de inibina, ativina, fatores de crescimento, ABP's e estrógenos. Já o LH atua diretamente nas células de Leydig estimulando a esteroidogênese bem como fatores de crescimento. (arquivo pessoal)..... 25

FIGURA 4 - Inervação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) liberando a Noradrenalina (NA) que interage com os receptores adrenérgicos alfa 1 e induzem a ativação da Proteína Gq que, por meio de sua subunidade alfa, estimula a hidrólise de PIP2, pela proteína Fosfolipase C, em IP3 e DAG. Os IP3 e DAG se difundem pelo citoplasma celular e induzem o influxo de cálcio do retículo endoplasmático (RE) para o citoplasma, que leva a contrações da musculatura lisa. (arquivo pessoal) 32

FIGURA 5 - As principais causas de não ejaculação são por desconforto e dor durante ao efetuar a monta, obstruções em região de colículos seminais ou ducto deferente, azoospermia e ejaculação retrógrada. O diagnóstico diferencial entre causas obstrutivas e azoospermia é realizado pela dosagem da enzima fosfatase alcalina associada ultrassonografia transretal das

glândulas sexuais anexas. Já o diagnóstico de dor ou instabilidade durante a monta requer uma avaliação clínica minuciosa geralmente associada a exames complementares. A ejaculação retrógrada é diagnóstica por sondagem vesical para recuperação da urina e avaliação da presença de espermatozoides. (arquivo pessoal)..... 38

FIGURA 6 - Coleta de sêmen por meio de indução farmacológica da ejaculação. A) Utilização de copo coletor acoplado a mucosa plástica. B) Utilização de suspensório com mucosa plástica posicionada ao redor do prepúcio e amarrada ao flanco por dois cordões laterais e um cordão transpassado entre os membros pélvicos. (arquivo pessoal) 42

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	19
Introdução e Justificativa	19
Revisão de Literatura	21
1. Anatomia funcional do aparelho reprodutor de garanhões.....	21
2. Neuroendocrinologia da reprodução	24
3. Mecanismos neurofisiológicos de ereção e ejaculação	27
3.1. Comportamento sexual normal de garanhões	27
3.2. Ereção e Ejaculação	28
4. Sistema autônomo simpático e receptores alfa adrenérgicos.....	30
5. Principais distúrbios que impedem a ejaculação	33
5.1. Distúrbios que impedem a cópula	33
5.2. Distúrbios ejaculatórios	34
6. Principais métodos de coleta de sêmen de garanhões	38
7. Indução farmacológica da ejaculação	41
7.1. Fármacos utilizados na indução farmacológica da ejaculação.....	42
7.1.1. Cloridrato de Imipramina	42
7.1.2. Agonistas alfa adrenérgicos	44
7.1.3. Ocitocina	46
7.1.4. Prostaglandina F 2 alfa	47
8. Protocolos de indução farmacológica da ejaculação	48
Referências.....	51
Objetivos.....	61
CAPÍTULO 2	62
ARTIGO 1: Efeito da adição de ocitocina em protocolos de indução farmacológica da ejaculação em garanhões	63
Resumo	64
1. Introdução	65
2. Materiais e Métodos.....	67
Animais e Local de Pesquisa	67
Delineamento Experimental	67
Protocolos Experimentais	67

Coleta e processamento do sêmen	67
Análise da cinética espermática	67
Avaliação morfofuncional espermática por citometria de fluxo	68
Análise Estatística	69
Análise da Morfologia Espermática	69
Análise e processamento da urina	70
Avaliação dos efeitos colaterais	70
3. Resultados	70
3.1. Taxa de Ejaculação	70
3.2. Características Seminais	71
3.3. Avaliação por citometria de fluxo	72
3.4. Efeitos adversos.....	73
4. Discussão	73
5. Conclusão	78
Referências	79

CAVALERO, T.M.S. NOVOS PROTOCOLOS UTILIZANDO ASSOCIAÇÕES COM OCITOCINA NA INDUÇÃO FARMACOLÓGICA DA EJACULAÇÃO EM GARANHÕES. Botucatu – SP. 2018. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A indução farmacológica da ejaculação é uma alternativa utilizada para aumentar a função ejaculatória de garanhões incapazes de ejacular pelos métodos tradicionais de coleta de sêmen. No entanto, os protocolos desenvolvidos até o presente momento apresentam baixas taxas de sucesso na indução da ejaculação, alta variabilidade de doses, vias de administração e efeitos adversos. A ocitocina é um hormônio que participa ativamente no desencadeamento da ejaculação, no entanto, não existem estudos avaliando sua atuação em protocolos de indução farmacológica da ejaculação. Nesse sentido, o presente estudo teve por objetivos: 1) Comparar a eficiência de diferentes protocolos na indução da ejaculação; 2) Avaliar a eficiência da ocitocina quando adicionada aos protocolos; 3) Comparar os parâmetros seminais de ejaculados coletados em vagina artificial e por indução farmacológica da ejaculação. Foram avaliados os protocolos X - Xilazina (0,66/mg/kg/i.v); XO - xilazina (0,66/mg/kg/i.v) + ocitocina (20UI/i.v); IX - Imipramina (3/mg/kg/v.o) + xilazina (0,66/mg/kg/i.v); IXO - Imipramina (3/mg/kg/v.o) + xilazina (0,66/mg/kg/i.v) + ocitocina (20UI/i.v); D- detomidina (0,02/mg/kg/i.v); DO - detomidina (0,02/mg/kg/i.v) + ocitocina (20 UI/i.v); ID-Imipramina (3mg/kg/v.o) + detomidina (0,02mg/kg/i.v); IDO-Imipramina (3mg/kg/v.o) + detomidina (0,02mg/kg/i.v) + ocitocina (20 UI/i.v); IO- Imipramina (3mg/kg/v.o) + ocitocina (20 UI/i.v). Nenhum dos 4 garanhões jovens ejacularam e 9 dos 12 (75%) garanhões adultos responderam a, pelo menos, 1 protocolo. Nenhum dos garanhões que responderam aos tratamentos com xilazina respondeu aos tratamentos com detomidina. Dois garanhões responderam ao X e XO (16,6%) em todas as tentativas, 4 garanhões responderam ao IX e IXO (33,33%) em 75% das tentativas. Um garanhão respondeu ao DO (8,33%) em todas as

tentativas, enquanto 5 ganhões responderam ao IDO (41,6%) em 70% dos tentativas. A ereção ocorreu em 5 ganhões (31,25%), enquanto a masturbação ocorreu em apenas 2 ganhões (16,6%). Ereção e masturbação não foram observados nos protocolos sem a administração de imipramina (X, XO, D e DO). Os ejaculados obtidos em DO e IDO tiveram menor volume total, menor volume de gel livre e maior concentração ($P < 0,05$), com um número total de espermatozoides, cinética e morfologia espermática semelhantes ($P > 0,05$) aos protocolos com xilazina (X, XO, IX e IXO) e ejaculados coletados por meio de vagina artificial. As características do sêmen sugerem diminuição dos fluidos das glândulas acessórias nos protocolos DO e IDO, provavelmente devido a não pré-estimulação sexual e também pelo uso de ocitocina, que aumenta contrações em cauda do epidídimo. Assim, a ocitocina parece desempenhar um papel na indução da ejaculação quando associada à detomidina, mas nenhuma quando associada à xilazina.

Palavras-chave: distúrbios ejaculatórios, sêmen, imipramina, detomidina, xilazina.

CAVALERO, T.M.S. NEW PROTOCOLS USING OXYTOCIN FOR PHARMACOLOGICALLY-INDUCED EJACULATION IN STALLION. Botucatu – SP. 2018. 82p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The pharmacological induction of ejaculation has been an alternative used to increase ejaculatory function of stallions incapable of ejaculating by the traditional methods of semen collection. However, the protocols developed to date are available in high rate of dose variation, routes of administration, adverse effects and ejaculation rates. In general, pharmacological protocols have shown low success rates in inducing ejaculation. Thus, the aims of the study were: 1) Compare the efficiency of different protocols to induce ex copula ejaculation when detomidine and oxytocin was added to the protocols; 2) Compare seminal parameters between in copula and ex copula ejaculates; We evaluated the nine protocols to ex copula ejaculation: X - xylazine (0.66mg/kg/i.v); XO - xylazine + oxytocin (20UI/i.v); IX - imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66mg/kg/i.v); IXO - imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66 mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI); D - detomidine (0.02mg/kg/i.v); DO - detomidine (0.02mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI/i.v); ID - imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v); IDO- imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v) + oxytocin (20 UI/i.v); IO- imipramine (3mg/kg/v.o) + oxytocin (20 UI/i.v). Four young stallions (2-3 y old) and 12 sexually mature stallions (6 to 26 y old) were each submitted to 2 treatment trials conducted at 3-day intervals. Induced ejaculates were collected into a plastic bag and compared with in copula ejaculates. None of the 4 young stallions ejaculated and 9 of the 12 mature stallions responded. Stallions that responded to xylazine did not respond to detomidine treatments. Two stallions responded to X and XO while 4 mature stallions responded to IX and IXO. One stallion respond to DO while 5 stallions responded to IDO. Erection occurred in 5 stallions and no erection and masturbation were observed in protocols without imipramine. The induced ejaculates obtained in DO and IDO had significantly ($P<0.05$) lower total volume, lower free-gel volume and higher concentration, with similar ($P>0.05$) total number of spermatozoa, sperm kinetics and

morphology compared to in copula ejaculates and xylazine protocols. The semen characteristics suggests decreased accessory glands fluids in protocols DO and IDO, probably resulting from the use of oxytocin, which increase the epididymal tail contraction. Thus, oxytocin appears to play a role to induce ejaculation when associated with detomidine, but not when associated with xylazine.

Key-words: imipramine, detomidine, xylazine, semen, ejaculatory disorders.

"O sucesso não é resultado de um fator único. Ele tem a ver com o alinhamento entre quem você é e onde você escolhe estar."

Eric Barker

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na medicina veterinária, as biotecnologias relacionadas a reprodução, como a coleta de sêmen e a inseminação artificial, são amplamente utilizadas por facilitarem o manejo reprodutivo e proporcionarem um melhor aproveitamento do garanhão. A técnica de inseminação artificial permite o uso de animais de alto valor genético em todo o território mundial, por meio do envio de sêmen criopreservado, sendo oficialmente aprovada por diversas associações de criadores de cavalos.

O método mais utilizado em garanhões para a coleta de sêmen é por meio de vagina artificial. No entanto, como esta técnica mimetiza a monta natural, diversas alterações físicas, reprodutivas e/ou comportamentais podem impedir ou dificultar este procedimento (MONTEIRO et al., 2011; AMANN, 2011).

Diversos fatores podem levar a incapacidade no ato da cobertura (impotência *coeundi*). São descritos diversos relatos de equinos machos apresentando afecções físicas associadas a impotência *coeundi*, tais como: fraturas ósseas, lesões em coluna vertebral, pododermatite asséptica difusa, fimose, parafimose e neoplasias proliferativas em pênis e prepúcio, como o carcinoma de células escamosas (EURIDES et al., 1997; FEARY et al., 2005; McKINNON et al., 2011; MENZIES-GOW, 2012; CHARCUR et al., 2014).

Desse modo, a colheita de sêmen de garanhões pelo método de indução farmacológica apresenta - se como uma ferramenta auxiliar importante para a preservação do material genético de garanhões impossibilitados de efetuar a monta (CARD et al., 1997; ROWLEY et al., 1999; McDONNEL, 2001).

A indução farmacológica da ejaculação tem por objetivo mimetizar os eventos neurofisiológicos que desencadeiam o processo de ejaculação (McDONNEL, 2001), embora estes mecanismos ainda não estão totalmente elucidados.

Estudos anteriormente desenvolvidos utilizando xilazina e associações de imipramina e xilazina apresentaram alta variabilidade de resultados, com resultados variando entre 27% e 68% de sucesso (McDONNELL; ODIAN, 1993; McDONNELL; TURNER, 1994; JONHSON et al., 1998; DUTRA, 2000).

O cloridrato de detomidina foi utilizado para induzir a ejaculação em jumentos, alcançando 20% de sucesso (MRACKOVA et al., 2013). Do mesmo modo, um relato de caso obteve sucesso na indução da ejaculação em um garanhão após a administração de detomidina (ROWLEY et al., 1999), no entanto, não existem pesquisas científicas comprovando a eficácia do uso do cloridrato de detomidina na indução farmacológica da ejaculação em garanhões.

O hormônio ocitocina, assim como outros hormônios que participam do controle parácrino e autócrino da função testicular, participa ativamente no desencadeamento da ejaculação pela indução de contrações rítmicas em epidídimos e túbulos seminíferos (VIGNOZZI et al., 2008), entretanto, não existem relatos de sua utilização na indução farmacológica da ejaculação.

Devido a alta variabilidade de resultados, as baixas taxas de sucesso na indução da ejaculação pelos protocolos desenvolvidos até o presente momento e a ineficiência da técnica de eletroejaculação na espécie equina, garanhões incapazes de ejacular pelo método de coleta tradicional são retirados dos programas de reprodução, acarretando em grandes prejuízos tanto econômicos quanto genéticos para a equideocultura mundial.

A utilização de protocolos farmacológicos eficientes na indução da ejaculação seria uma alternativa importante para impedir o descarte de garanhões diagnosticados com enfermidades relacionadas a incapacidade de efetuar a monta, alterações na libido, déficit de ereção, traumas psicológicos ou distúrbios ejaculatórios, garantindo conseqüentemente a preservação do material genético desses animais.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Anatomia funcional do aparelho reprodutor de garanhões

O conhecimento dos parâmetros morfológicos e fisiológicos normais do aparelho reprodutor de garanhões é fundamental para identificar alterações reprodutivas, otimizar manejo reprodutivo e avaliar o potencial fértil do animal. O aparelho reprodutor do macho equino consiste em pênis, prepúcio, quatro pares de glândulas anexas, um par de testículos e epidídimos protegidos pelo escroto, e ligados a cavidade abdominal pelos cordões espermáticos. Cada cordão espermático é formado por nervos, vasos linfáticos, ducto deferente, músculo cremâster interno, veias e artéria testicular e túnica vaginal, que migram da cavidade abdominal através do anel inguinal e se conectam ao testículo (BLANCHARD; VARNER, 1992; AMANN, 2011).

Na espécie equina, o pênis é considerado do tipo músculo-cavernoso, assim denominado devido a sua composição histológica, sendo constituído por musculatura isquiocavernosa em sua região dorsal, formando os corpos cavernosos, circundados por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso denominada de túnica albugínea. Os corpos cavernosos compartilham de uma estrutura septada bastante irrigada em toda a sua extensão, o que permite o influxo e a difusão sanguínea durante o processo de ereção. A região ventral do pênis é formada pelo corpo esponjoso, músculo bulboesponjoso, o qual circunda a uretra peniana, e músculo retrator do pênis (Figura 1 e 2) (AMANN, 2011).

O aporte sanguíneo peniano é originário da artéria obturatória, que forma a artéria dorsal do pênis, e das artéria pudenda interna e artéria pudenda externa, que formam a artéria cranial do pênis. A inervação é derivada dos nervos pudendos e plexo pélvico. As principais vias de vascularização e inervação peniana estão localizadas dorsalmente, e tem íntima relação com a função dos corpos cavernosos (GETTY, 1981).

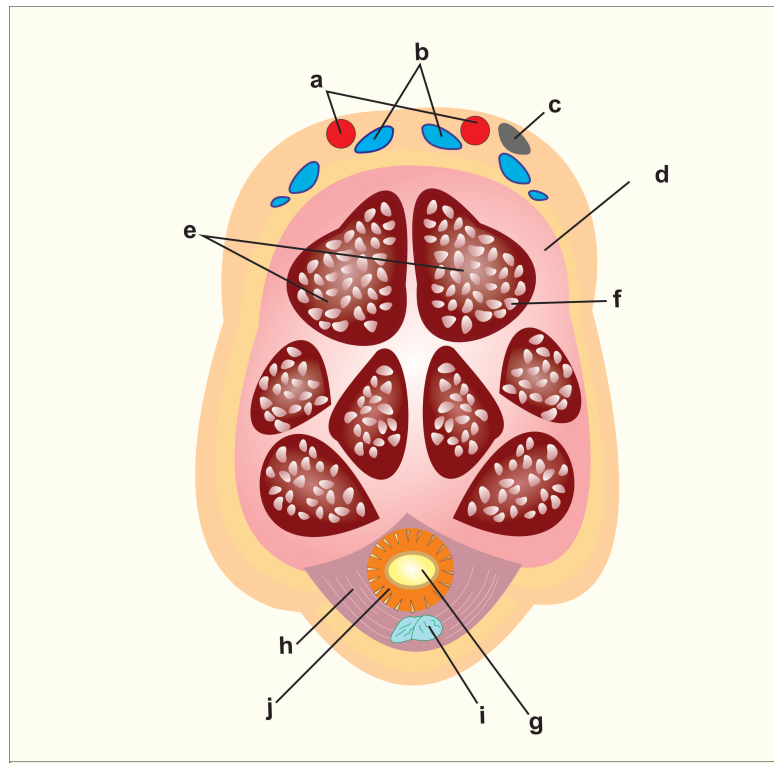


FIGURA 1 - Corte transversal do corpo do pênis. a) artéria dorsal do pênis, b) veia dorsal do pênis, c) nervo dorsal do pênis, d) túnica albugínea, e) corpo cavernoso do pênis, f) trabéculas, g) uretra, h) músculo bulboesponjoso, i) músculo retrator do pênis, j) corpo esponjoso do pênis. (arquivo pessoal)

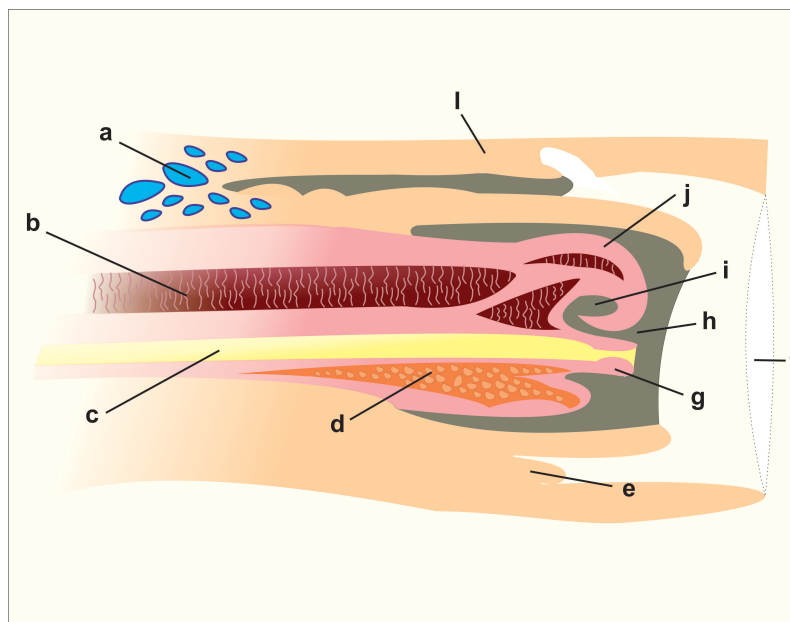


FIGURA 2 - Corte lateral de pênis e prepúcio. a) plexo venoso dorsal, b) corpo cavernoso do pênis, c) uretra, d) corpo esponjoso do pênis, e) prega prepucial, f) orifício prepucial, g) processo uretral, h) fossa da glândula, i) sinus uretral, j) coroa da glândula, l) parede abdominal. (arquivo pessoal)

O pênis quando não ereto, é protegido pelo prepúcio, epitélio de revestimento subdividido em lâminas prepuciais interna e externa. A lâmina prepucial externa forma o orifício prepucial enquanto a lâmina interna constitui a prega prepucial (figura 2). Durante o processo de ereção o orifício prepucial está localizado na base peniana enquanto a prega prepucial, em continuidade com o orifício prepucial, constitui o revestimento epitelial do terço médio-final do pênis (AMANN, 1981; 2011).

O escroto consiste em uma bolsa de revestimento a qual abriga os testículos, epidídimos e cordão espermático. É constituído por uma camada de tecido epitelial, túnica dartos, fáscia escrotal e lâmina parietal da túnica vaginal. Desse modo, o escroto, por meio dos mecanismos de contração e relaxamento da túnica dartos e do músculo cremáster promovem a termorregulação testicular. Sua camada externa de tecido epitelial é altamente rica em glândulas sudoríparas e sebáceas, o que contribui para a dissipação do calor e manutenção da temperatura testicular (AMANN, 1981; 2011).

Os testículos são as gônadas sexuais masculinas, sendo estes revestidos por tecido conjuntivo fibroso denominado de túnica albugínea e inseridos no interior das lâminas visceral e parietal da túnica vaginal. Em garanhões, os testículos apresentam formato ovóide e posição horizontal, com consistência fibro-elástica e volume testicular variando de acordo com a raça. Possuem função mista, sendo responsáveis pela gametogênese e produção de diversos hormônios (TURNER, 1998; AMANN, 2011). A inervação testicular é derivada dos plexos renais e mesentérico caudal (GETTY, 1986), de modo que, o parênquima testicular apresenta ramificações nervosas provenientes exclusivamente do sistema nervoso autônomo simpático (RISLEY; SKREPTOS, 1964).

Os epidídimos são ductos enovelados subdivididos anatomicamente entre cabeça, corpo e cauda. Apresentam cerca de 70 metros de comprimento quando não enovelados. A cabeça é originária dos ductos eferentes e está posicionada lateralmente ao cordão espermático, prolongando-se pela região dorsal do testículo com formato cilíndrico onde passa a denominar-se corpo do epidídimo. O segmento final do epidídimo está localizado no pólo caudal do testículo, denominando - se assim cauda do epidídimo. A cauda do epidídimo

armazena 70% do total de espermatozoides encontrados nos testículos de garanhões (SULIVAN et al., 2005).

Desse modo, os epidídimos são importantes reservatórios de espermatozoides fora dos testículos, sendo responsáveis por alterações físico-químicas que garantem a sobrevivência dessas células por semanas, bem como a maturação espermática antes da ejaculação (SULIVAN et al., 2005, AMANN, 2011).

Garanhões possuem um conjunto de glândulas sexuais acessórias formado por um par de ampolas, um par de vesículas seminais, uma próstata bilobulada e um par de glândulas bulbouretrais (GETTY, 1986). As glândulas sexuais acessórias são responsáveis pela produção do plasma seminal, o qual representa cerca de 95% do volume total do ejaculado, sendo o restante formado por espermatozoides provenientes da cauda dos epidídimos (BLANCHARD; VARNER, 1992).

2. Neuroendocrinologia da reprodução no garanhão

A atividade reprodutiva em equinos é mediada por sinalizadores hormonais que mantêm a comunicação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal equilibrada (Figura 3). Essa comunicação é realizada por sinalizações endócrinas, parácrinas e autócrinas. Embora os mensageiros provenientes dessas vias de comunicação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, bem como as estruturas anatômicas envolvidas nesse processo, estejam bem identificadas, a maneira com que esses mensageiros se relacionam e modulam a atividade reprodutiva ainda não foi completamente esclarecida (ROSER, 2008).

A espécie equina apresenta atividade reprodutiva sazonal característica de dias longos (BEN SAAD e MAUREL, 2002). O hormônio melatonina, produzido pela glândula pineal, tem um papel importante na regulação sazonal da atividade reprodutiva. O aumento na secreção de melatonina está relacionado com a diminuição de liberação do Hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Em vista disso, é possível observar diminuição da libido e redução do volume testicular nos períodos de menor disponibilidade de luz em países com estações do ano bem definidas (SHARP et al., 1993;

MALPAUX et al., 2001). Do mesmo modo, Jonhson e Thompson (1983) observaram durante os meses de verão um aumento de 36% na quantidade de células de Sertoli, e, conseqüente, um aumento do volume testicular e da produção diária de espermatozoides.

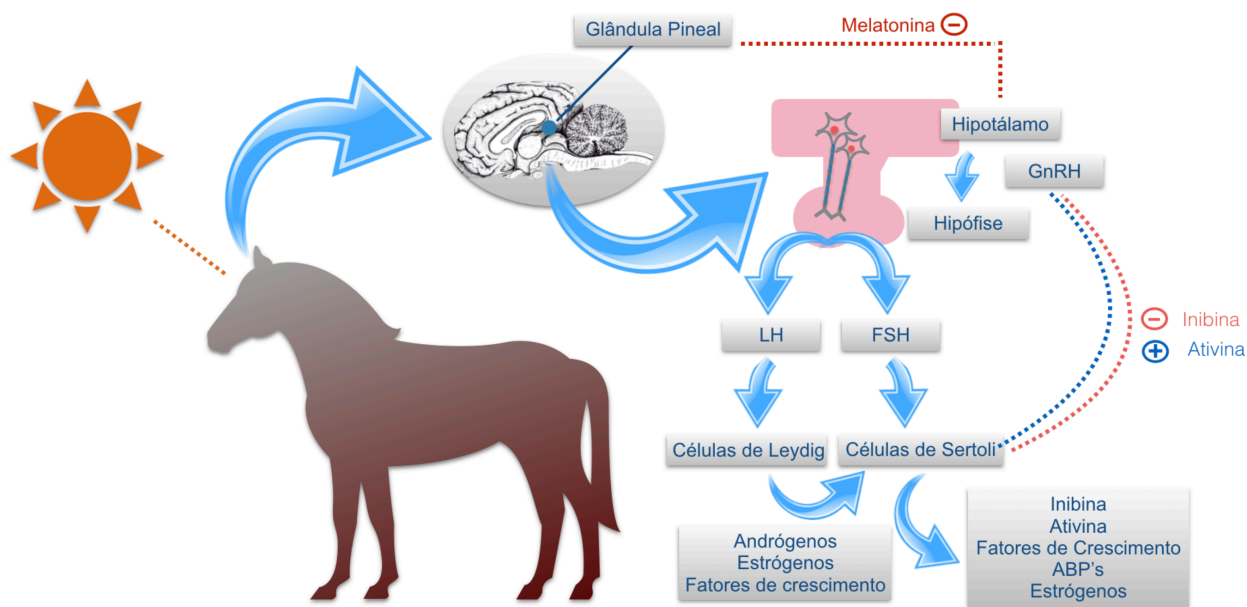


FIGURA 3 - O aumento do fotoperíodo diminui a melatonina circulante, reduzindo o feed back negativo ao hipotálamo, que aumenta a produção e liberação de GnRH. Este hormônio atua na adenohipófise estimulando a liberação dos hormônios FSH e LH. O FSH atua nas células de Sertoli induzindo a síntese de inibina, ativina, fatores de crescimento, ABP's e estrógenos. Já o LH atua diretamente nas células de Leydig estimulando a esteroidogênese bem como fatores de crescimento. (arquivo pessoal)

O GnRH é produzido em padrões pulsáteis pelo hipotálamo, que por neurônios hipotalâmicos atinge a glândula hipófise e promove a produção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). O FSH apresenta receptores nas células de Sertoli, estimulando a gametogênese. Já o hormônio LH atua nas células de Leydig, induzindo a esteroidogênese (andrógenos e estrógenos). A produção do hormônio testosterona pelas células de Leydig é fundamental para o desenvolvimento das características físicas e comportamentais do macho devido as suas funções anabólicas e androgênicas (AMANN, 1993; ROSER, 2001; ROSER, 2008).

O *feed back negativo* promove a manutenção dos níveis hormonais em equilíbrio. Desse modo, o aumento do FSH circulante induz a produção do hormônio inibina, que causa um *feed back negativo* para a produção do hormônio FSH. De forma oposta, quando os níveis de FSH estão baixos, as células de sertoli produzem o hormônio ativina, que parece estimular sua produção, gerando um *feed back positivo* para o FSH (ZIRKIN et al., 1994).

Os hormônios estrógeno e testosterona também estão relacionados com a modulação da produção de FSH. Estudos *in vitro* correlacionaram a ação do 17β estradiol com o aumento na liberação de LH e redução da secreção de FSH (ROSER, 2001; ROSER, 2008). Johnson e Thompson (1983) em estudo realizado na América do Norte em garanhões, observaram uma redução de 50% dos níveis plasmáticos de LH durante os meses de inverno. No entanto, em animais castrados as concentrações de LH se mantêm constantes durante todo o ano (IRVINE; ALEXANDER, 1982).

Em resposta ao FSH as células de Sertoli sintetizam estradiol, ativina, inibina e diversos fatores de crescimento como o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), fator de transformação de crescimento beta (TGF - β), interleucinas e proteínas ligadoras de andrógenos (ABP) (SHARPE, 1983). As ABPs são glicoproteínas que carregam especificamente os hormônios testosterona, di-hidrotestosterona e 17β estradiol. A ligação desses hormônios às ABPs aumenta sua lipossolubilidade, concentrando-os no ambiente testicular, no qual são fundamentais para a espermatogênese. O ambiente testicular equino apresenta concentrações de estrógenos extremamente elevadas quando comparado as demais espécies. O estrógeno parece ter um efeito tanto na produção espermática quanto na modulação das funções celulares dos testículos (ROSER, 2001; ROSER, 2008).

O envolvimento das sinalizações parácrinas e autócrinas é fundamental na regulação tanto da espermatogênese quanto da esteroidogênese (ROSER, 2008). Hormônios como a prolactina, hormônio do crescimento e hormônio tireoideano parecem estar relacionados à síntese de receptores de LH e andrógenos nas células de Leydig, estimulando a espermatogênese. Fatores como o IGF - 1, sintetizado tanto pelas células de Leydig quanto de Sertoli, também estimulam a esteroidogênese. Contrariamente, peptídeos semelhantes

ao GnRH, TGF - β e opióides apresentam efeito inibitório na produção de testosterona (CHUZEL et al., 1996).

Fatores autócrinos, como vasopressina e ocitocina, também parecem estar envolvidos na modulação da produção de testosterona. A ocitocina parece ter um papel estimulante, enquanto a vasopressina apresenta efeito inibitório na produção de testosterona. A ocitocina atua também nas células peritubulares mióides dos túbulos seminíferos induzindo contrações destes túbulos e consequente ejeção espermática para a *rede testis* (THACKARE et al., 2006). A ocitocina também tem sido considerada importante durante o processo ejaculatório (VIGNOZZI et al., 2008; CORONA et al., 2012).

A produção do hormônio testosterona também interfere nos processos de ereção e ejaculação. Estudos em ratos e humanos observaram que altas concentrações de testosterona sérica estão relacionadas a ejaculação precoce enquanto baixos níveis relacionam-se com ejaculação retardada, baixo volume do ejaculado, baixa libido e déficit de ereção. Do mesmo modo, o hipertireoidismo também tem sido relacionado a ejaculação precoce, aumento de contrações em vesícula seminal e em musculatura peniana bulboesponjosa de camundongos (CORONA et al., 2012). Os estrógenos, principalmente o estradiol, participam da fase de emissão da ejaculação por induzir contrações epididimárias. O estradiol também aumenta a sensibilidade dos receptores de ocitocina, potencializando os efeitos da ocitocina durante o processo ejaculatório (VIGNOZZI et al., 2008; FILIPPI et al., 2002a). O hormônio cortisol apresenta elevação plasmática durante o estímulo sexual, mas não tem atuação no processo ejaculatório (VILLANI et al., 2006).

3. Mecanismos neurofisiológicos de ereção e ejaculação

3.1. Comportamento sexual de garanhões

Em ambientes de vida livre, sem a intervenção humana, a espécie equina tem uma organização social pré-estabelecida. Nesse contexto, um único garanhão apresenta um harém de éguas. Embora alguns rituais relacionados ao comportamento sexual tenham sido suprimidos, os garanhões

continuam exibindo comportamentos específicos no momento da cópula. Esse padrão comportamental auxilia na identificação de garanhões com alterações sexuais relacionadas a um comportamento sexual anormal (MCDONNELL, 1992).

O garanhão quando colocado em contato com uma égua no estro, apresenta um comportamento pré-copulatório de investigação. São observados padrões relacionados a cheirar, lambe, morder e vocalizar durante a corte, geralmente seguidos pelo reflexo de Flehmen. Acredita-se que o reflexo de Flehmen, caracterizado pela elevação de cabeça e pescoço, associada ao levantamento do lábio superior, facilita o movimento de fluidos provenientes da égua para o órgão vomeronasal (STAHLBAUM; HOUP, 1989; McDONNELL, 1992; McDONNELL, 2000).

Esse comportamento pré-copulatório de exploração da fêmea desencadeia rapidamente o processo de ereção. Em garanhões normais a ereção leva de 1 a 2 minutos para ocorrer. Já a ejaculação, normalmente, ocorre após o primeiro ou segundo salto em 90% dos garanhões (McDONNELL, 1992).

A masturbação também é um comportamento comum em equídeos, com animais podendo apresentar esse comportamento a cada 90 minutos independente de estímulo sexual. Caracteriza-se por movimentos rítmicos do pênis ereto contra a parede abdominal associada a intumescência da glândula peniana. A eliminação de fluido pré-seminal e movimentos pélvicos são frequentemente observados durante a masturbação, no entanto, a ejaculação é incomum (McDONNELL, 1992).

3.2. Ereção e ejaculação

A ereção é um evento hemodinâmico que resulta em relaxamento arteriolar em resposta à liberação do neurotransmissor óxido nítrico (NO). Diante do estímulo sexual, respostas neuronais induzem a liberação de NO pela via parassimpática não-adrenérgica não-colinérgica na musculatura lisa e endotelial do corpo cavernoso e, em menor quantidade, do corpo esponjoso do pênis. O NO ativa a guanilato ciclase, aumentando a síntese do segundo

mensageiro GMPc. O GMPc interage com a proteína G (PKG) causando a fosforilação de substratos que levam ao sequestro e extrusão dos íons cálcio. Essa diminuição do cálcio intracelular leva ao relaxamento muscular (TRAISH et al., 2000; CORBIN et al., 2002; DEAN; LUE, 2005).

O relaxamento da musculatura lisa trabecular e arteriolar, diminui a resistência vascular e, conseqüentemente, promove um influxo sanguíneo para o interior da musculatura peniana (ANDERSON, 2001).

Concomitantemente, devido ao aumento da pressão intracavernosa o complexo venoso é comprimido e estenosado, diminuindo o retorno venoso, favorecendo ainda mais o aumento da pressão intracavernosa. Esse aumento de volume sanguíneo no interior do pênis é responsável pelo aumento de tamanho e enrijecimento do mesmo, sendo este processo denominado de ereção peniana (ANDERSON, 2001; CORBIN et al., 2002; DEAN; LUE, 2005).

A ejaculação consiste em um conjunto de eventos neurofisiológicos sincronizados que culminam em duas diferentes fases: emissão e expulsão. A fase de emissão é caracterizada pela liberação dos espermatozoides através do ducto deferente até a uretra pélvica, no qual estes se misturam ao plasma seminal que é, concomitantemente, liberado pelas glândulas sexuais anexas (CLEMENT; GIULIANO, 2016).

Em garanhões, a fase de emissão é precedida por cerca de 7 a 9 movimentos penianos intravaginais que desencadeiam o reflexo de emissão seminal. Esse reflexo induz contrações musculares rítmicas na cauda do epidídimo, ducto deferente, ampola, vesícula seminal, próstata e, provavelmente, glândulas bulbouretrais, levando a liberação dos espermatozoides e fluido oriundo das glândulas anexas na uretra pélvica. Simultaneamente ocorre a contração do esfíncter vesical, evitando o contato do sêmen com urina (MCDONNELL, 1986; MCDONNELL, 1992).

A fase de expulsão é desencadeada imediatamente após a fase de emissão e leva a eliminação do conteúdo seminal através do processo uretral em cerca de 7 jatos de sêmen (TISHNER et al., 1974, KOSINIAK et al., 1975). A expulsão ocorre devido a contrações da musculatura estriada pélvica e perianal associadas a contrações rítmicas da musculatura peniana isquiocavernosa, bulboesponjosa e uretral. Simultaneamente, devido a

contrações musculares perianais, os garanhões apresentam um reflexo de levantamento da cauda em cada jato de sêmen emitido (MCDONNELL, 1986).

A fase de expulsão apresenta três frações distintas, de acordo com o tipo de secreção predominante. A primeira fração, denominada de pré-espermática, é oriunda de fluidos prostáticos, sem a presença de espermatozoides. A segunda fração é caracterizada pela alta concentração de espermatozoides provenientes dos epidídimos. A terceira fração, também denominada de fração gel, é proveniente das vesículas seminais, apresentam consistência viscosa e poucos espermatozoides, remanescentes da segunda fração (AMANN, 1993).

Diferentemente do processo de ereção, os mecanismos de desencadeamento da ejaculação ainda não estão totalmente elucidados. Sabe-se que a ativação dos sistemas nervoso autônomo (SNA) e somático são fundamentais para desencadear o processo ejaculatório. Estudos neuroanatômicos em humanos indicam que tanto o sistema nervoso autônomo parassimpático quanto o simpático são importantes durante a ejaculação. No entanto, a participação parassimpática ainda continua questionável (CLEMENT; GIULIANO, 2016).

4. Sistema nervoso autônomo simpático e receptores alfa adrenérgicos

O sistema nervoso é subdividido em central e periférico. O sistema nervoso periférico divide-se em sistema nervoso somático (SNS) e SNA (FANTONI; CORTOPASSI, 2002). O SNS caracteriza-se por fibras sensoriais que mediam informações da pele, musculatura esquelética e articulações. O SNA é responsável pelas funções involuntárias e viscerais relacionadas a musculatura lisa, músculo cardíaco e glândulas (SANTOS et al., 2012). O sistema nervoso autônomo divide-se em parassimpático e simpático exercendo efeitos opostos e complementares sobre as funções fisiológicas que regulam.

O plexo nervoso pélvico apresenta inervações do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático. Apresentam ramos eferentes que passam bilateralmente as vísceras pélvicas, incluindo órgãos sexuais, bexiga e esfíncter vesical (YANG; JIANG, 2009).

As fibras nervosas eferentes do sistema autônomo simpático emergem do segmento lombossacral da medula espinhal como fibras pré-ganglionares (MCDONNELL, 1992). Essas fibras pré-ganglionares fazem sinapse com as fibras denominadas pós-ganglionares, cujo corpo se localiza nos gânglios autônomos presentes por todo o organismo (SANTOS et al., 2012).

Em equinos, as fibras nervosas pré-ganglionares oriundas do segmento lombosacral da medula espinhal se conectam ao plexo mesentérico caudal do sistema nervoso autônomo simpático e emitem ramos para todo o aparelho reprodutor masculino (MCDONNELL, 1992).

A sinalização neuronal entre as fibras pré e pós-ganglionares simpáticas é mediada pela acetilcolina, enquanto a comunicação entre as fibras nervosas pós-ganglionares e os órgãos efetores é mediada pelo grupo de neurotransmissores das catecolaminas (Noradrenalina e Adrenalina). Desse modo, as catecolaminas tem função biológica na fenda sináptica ao se ligarem aos receptores denominados adrenérgicos. Os receptores adrenérgicos são subdivididos em receptores alfa, beta e dopaminérgicos (GILSBACH et al., 2011).

A inervação autônoma simpática é fundamental no processo ejaculatório, pois tanto a fase de emissão seminal quanto o fechamento do esfíncter vesical são mediadas por ação da inervação simpática. O SNA simpático atua no aparelho reprodutor masculino por estimulação direta dos receptores alfa-adrenérgicos presentes nas junções pós-ganglionares da musculatura lisa do aparelho reprodutor masculino (ZHONG; MINNEMAN, 1999; TRASH et al., 2000).

A estimulação simpática no aparelho reprodutor masculino induz a liberação de noradrenalina (NA) na fenda sináptica que se liga e ativa os receptores pós-ganglionares alfa 1 e alfa 2 - adrenérgicos. Os receptores alfa adrenérgicos quando ativados induzem contração muscular.

Os receptores alfa 1 adrenérgicos por mudança na conformação ativam a proteína Gq que se dissocia em subunidades alfa e beta. A subunidade alfa interage com a Fosfolipase C estimulando a hidrólise de 4,5 bifosfato de Inositol (PIP2) em 1,4,5 trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) conforme ilustrado na Figura 4. O IP3 se difunde pelo citoplasma celular e induz a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. O DAG na presença

de cálcio intracelular ativa a proteína quinase C (PKC), que induz mais liberação de cálcio intracelular (TRAISH et al., 2000).

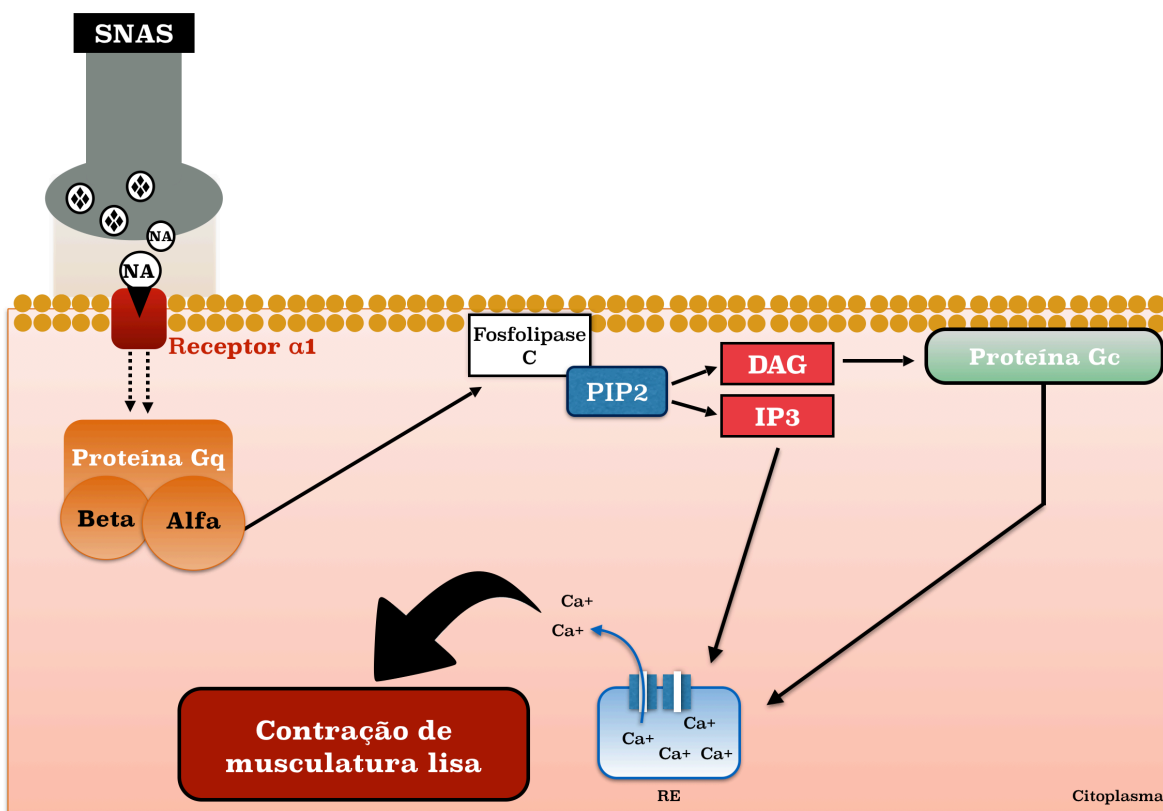


FIGURA 4 - Inervação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) liberando a noradrenalina (NA) que interage com os receptores adrenérgicos alfa 1 e induzem a ativação da Proteína Gq que, por meio de sua subunidade alfa, estimula a hidrólise de PIP2, pela proteína Fosfolipase C, em IP3 e DAG. Os IP3 e DAG se difundem pelo citoplasma celular e induzem o influxo de cálcio do retículo endoplasmático (RE) para o citoplasma, que leva a contrações da musculatura lisa. (arquivo pessoal)

Os mecanismos de desencadeamento da contração muscular pelos receptores alfa 2 adrenérgicos diferem dos receptores alfa 1 adrenérgicos. A ativação dos receptores alfa 2 promove a inibição da Adenilato ciclase, diminuindo assim o segundo mensageiro AMP cíclico intracelular e, conseqüentemente, reduz a função da proteína quinase A (PKA), promovendo aumento do cálcio intracelular (TRAISH et al., 2000).

A contração da musculatura lisa é desencadeada pela combinação dos íons cálcio com a calmodulina que promovem a ativação da miosina quinase e, conseqüente, a fosforilação da cabeça da miosina (TRAISH et al., 2000).

5. Principais alterações que impedem a ejaculação

5.1. Disfunções que impedem a cópula

Os distúrbios relacionados a cópula estão geralmente associados a alterações do aparelho reprodutor masculino de origem congênita ou adquirida. As alterações congênitas podem estar associadas a estenoses como a fimose e aplasia ou hipoplasia do ducto deferente (ESTRADA et al., 2003).

A baixa libido é um distúrbio comumente observado em equinos, principalmente em garanhões jovens e inexperientes. Na maioria dos casos o reduzido interesse sexual está relacionado com inexperiência e imaturidade sexual e não com anormalidades endócrinas. Proporcionar ambientes próximos a éguas e reduzir o contato com outros garanhões pode melhorar o comportamento sexual. Do mesmo modo, punições e reforços negativos durante as tentativas de coleta de sêmen devem ser evitadas a fim de não causar traumas psicológicos. Em garanhões adultos, calendários extenuantes de coletas, degeneração testicular, sensibilidade dolorosa ou desconforto durante a cópula, bem como doenças com alterações sistêmicas podem causar redução da libido. Protocolos farmacológicos podem ser utilizados para melhorar libido ou reduzirem a ansiedade do animal durante a cópula (McDONNELL, 1992; McDONNELL, 2005).

Diferentemente da baixa libido, em quadros de disfunção erétil a libido do animal permanece normal, porém com reduzida intumescência dos corpos cavernosos do pênis. Em garanhões com déficit de ereção e libido normal o animal geralmente realiza a monta, mas não consegue efetuar a intromissão do pênis na vagina da égua ou mesmo na vagina artificial (McDONNELL, 1999).

A maioria dos casos de disfunção erétil é decorrente de um processo traumático em pênis como coices, acidentes durante a cópula, quadros de priapismo e parafimose. Lesões da inervação e irrigação pélvica também podem ocasionar disfunção erétil como trombozes e traumas em medula espinhal. Embora a ereção não seja essencial para que ocorra a ejaculação, a maioria dos animais com disfunção erétil não conseguem obter estímulo suficiente para desencadear o processo ejaculatório (McDONNELL, 1999).

Lesões traumáticas em pênis e prepúcio quando não tratadas adequadamente podem ocasionar aderências penianas e prepuciais que podem estar associadas a estenoses do óstio prepucial, impossibilitando a exposição peniana e, conseqüentemente, a cópula (ALVARENGA;PAPA, 2009).

Os distúrbios relacionados a cópula também podem ocorrer secundários a afecções adquiridas como neoplasias em pênis e prepúcio. Em equinos, neoplasias como o carcinoma de células escamosas apresentam alta incidência no atendimento clínico de alterações reprodutivas de pênis e prepúcio (BACCARIN et al., 2011). Como as lesões são irreversíveis e a penectomia é o tratamento preconizado na maioria dos casos, diversos animais tem sua vida reprodutiva prematuramente interrompida (DIAS et al., 2013).

5.2. Distúrbios ejaculatórios

Os distúrbios ejaculatórios são caracterizados como o não desencadeamento do processo ejaculatório mesmo quando todos os demais parâmetros relacionados ao comportamento sexual apresentam-se normais (McDONNELL, 1992). Alterações músculo-esqueléticas e neurológicas são as principais causas de distúrbios ejaculatórios em garanhões (McDONNELL, 1999).

Os principais distúrbios ejaculatórios estão subdivididos em: não ejaculação, ejaculação prematura, ejaculação incompleta e urospermia. Em estudo realizado por McDonnell (1992) a não ejaculação representou 59% dos casos de distúrbio ejaculatório atendidos, seguido por 36% de urospermia e 3% de ejaculação precoce.

A ejaculação precoce é uma condição rara em equinos, caracterizada pela ejaculação antes que o garanhão introduza devidamente o pênis e realize os movimentos de propulsão para estimulação da glândula. Embora a etiologia desse distúrbio não seja conhecido, compressas de água fria parecem retardar a ejaculação nesses animais (McDONNELL, 1992).

As principais causas de não ejaculação estão relacionadas a sensibilidade dolorosa durante a cópula, ejaculação retrógrada, disfunção

psicogênica e obstruções do aparelho reprodutor masculino. O tratamento é dependente da causa primária de cada alteração.

Alterações relacionadas ao aparelho locomotor como afecções podais, lesões musculares, inflamações de articulações e ligamentos e osteoartrites, principalmente em membros posteriores podem gerar desconforto e dor, causando falha ejaculatória. Ao efetuar a monta o garanhão deposita a maior parte do seu peso corporal nos membros posteriores, de modo que qualquer alteração dolorosa nesses membros se tornam muito mais intensas nesse momento e podem afetar a libido após sucessivas tentativas frustradas (McDONNELL, 2005).

Sensibilidade dolorosa também podem ser observadas em garanhões com alterações na região lombar da coluna vertebral e secundário a inflamações e infecções como uretrite, orquite e vesiculite seminal. Do mesmo modo, enfermidades músculo-esqueléticas muitas vezes podem provocar fragilidade muscular e conseqüente instabilidade ao efetuar a monta, sendo também uma causa primária de não ejaculação (ALVARENGA;PAPA, 2009).

Garanhões com comportamento sexual normal e que ao efetuarem a monta não manifestam os movimentos de propulsão pélvica característicos da cópula geralmente apresentam fragilidade osteomuscular, desconforto ou sensibilidade dolorosa. Essas alterações levam desmonta prematura e repentina, vocalizações finas, e conseqüentemente, a não ejaculação (McDONNELL, 1992).

As disfunções psicogênicas são geralmente desencadeadas por traumas no momento da cópula como coices, vaginas artificiais com temperaturas muito elevadas e manejo inadequado durante a cobertura. Os sinais clínicos são similares a dor e fraqueza osteomuscular, no entanto, podem ser observados alguns movimentos de propulsão pélvica. O tratamento é baseado principalmente em alterações no manejo, reduzindo o estresse, garantindo o máximo grau de excitação antes da monta, alterando o ambiente de coleta e evitando punições durante as tentativas de coleta. Alguns ansiolíticos também podem ser utilizados para reduzir o estresse do animal (McDONNELL, 1990).

Diferentemente dos comportamentos associados a dificuldades em atingir a ejaculação, alguns distúrbios relacionados as fases de emissão e expulsão durante o processo ejaculatório podem resultar em comportamento característico da ejaculação, acompanhado de movimentos de cauda, contrações uretrais e sinais de relaxamento (POZOR et al., 2011).

Esses distúrbios associados a movimentos característicos de ejaculação estão principalmente relacionados a ejaculação retrógrada e obstruções congênitas ou adquiridas dos ductos deferentes e ampolas (McDONNELL, 1992; ESTRADA et al., 2003; POZOR et al., 2011).

A ejaculação retrógrada caracteriza-se pelo relaxamento do esfíncter vesical com conseqüente influxo do sêmen para o interior da bexiga no momento da fase de expulsão seminal da ejaculação. O diagnóstico é realizado por meio de sondagem vesical e avaliação da presença de grandes quantidades de espermatozoides na urina. A urospermia apresenta a mesma etiopatologia da ejaculação retrógrada, no entanto, na urospermia a urina extravasa da bexiga e é eliminada juntamente com o ejaculado, causando diferentes graus de contaminação do sêmen. A administração do cloridrato de imipramina tem obtido bons resultados tanto no tratamento da ejaculação retrógrada quanto de urospermia. Os esvaziamento da bexiga por meio de sonda uretral, diuréticos ou micção natural antes da coleta de sêmen também são importantes ferramentas para reduzir a contaminação seminal com urina (TURNER et al 1995; BRINSKO 2001).

As obstruções bilaterais das ampolas seminais podem causar falha ejaculatória, de modo que o garanhão apresenta todos os sinais característicos da ejaculação, mas somente o plasma seminal é obtido ao final do processo. O diagnóstico é baseado em exame complementar de ultrasonografia transretal para visualização da ecogenicidade e tamanho das ampolas seminais (McDONNELL, 1992) associado a dosagem enzimática de fosfatase alcalina (TURNER;McDONNELL, 2003). O tratamento preconizado é baseado em massagens manuais das ampolas associada a administração de Ocitocina (20 UI/i.v) 20 minutos antes da tentativa de coleta de sêmen (McDONNELL, 1992).

Obstruções também podem ser observadas na região dos colículos seminais de garanhões devido a presença de cistos. A quantidade e tamanho das estruturas císticas podem causar dificuldade ejaculatória com episódios intermitentes de falha ejaculatória e obtenção do ejaculado após diversas tentativas de coleta. Os movimentos de propulsão pélvica são observados por períodos prolongados e movimentos relacionados a ejaculação não são observados, com ausência de plasma seminal ao final do processo. As massagens para obstrução de ampola são geralmente ineficazes, já que os cistos são constantemente preenchidos e não podem ser removidos como ocorre nos casos de massas obstruindo a ampola seminal. No entanto, a aplicação de ocitocina associada a compressas quentes na base do pênis parecem melhorar a função ejaculatória desses animais (POZOR et al., 2011).

A aplasia segmentar bilateral de ducto deferente também é descrita como uma causa de falha ejaculatória em garanhão jovem. Como esta obstrução é de origem congênita, nenhum dos tratamentos preconizados para as obstruções adquiridas de ampola e colículos seminais são eficientes (ESTRADA et al., 2003).

É importante ressaltar as diferenças entre animais com um quadro clínico de azoospermia e animais com distúrbios ejaculatórios relacionados a não ejaculação. A azoospermia é conceituada como a ausência de espermatozoides no ejaculado e tem como causa alterações graves da espermatogênese (BALL, 2008). A degeneração testicular é a causa primária de distúrbios na espermatogênese que podem culminar na redução total da produção de espermatozoides, caracterizando assim o quadro de azoospermia (ALVARENGA;PAPA, 2009). Nesses casos o garanhão consegue ejacular normalmente e os fluidos epididimários e das glândulas anexas são coletados sem, no entanto, haver a presença de espermatozoides (BALL, 2008).

A enzima fosfatase alcalina (FA) pode ser utilizado como um marcador de ejaculação devido a sua alta concentração no fluido testicular e epididimário. Desse modo, reduzidas concentrações de FA (97 UI/L) no ejaculado são indicativos de obstruções, enquanto concentrações de normais FA (595 - 3409 UI/L) na ausência de espermatozoides são característicos de azoospermia (TURNER; McDONNELL, 2003).

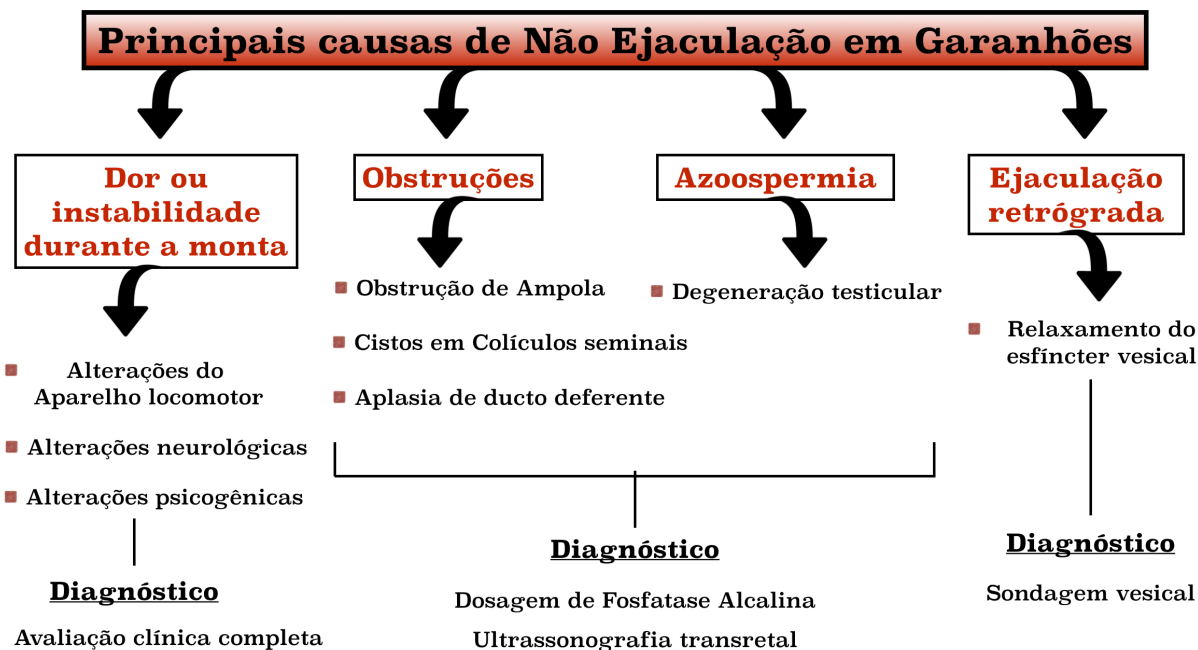


FIGURA 5 - As principais causas de não ejaculação são por desconforto e dor durante ao efetuar a monta, obstruções em região de colículos seminais ou ducto deferente, azoospermia e ejaculação retrógrada. O diagnóstico diferencial entre causas obstrutivas e azoospermia é realizado pela dosagem da enzima fosfatase alcalina associada ultrassonografia transretal das glândulas sexuais anexas. Já o diagnóstico de dor ou instabilidade durante a monta requer uma avaliação clínica minuciosa geralmente associada a exames complementares. A ejaculação retrógrada é diagnóstica por sondagem vesical para recuperação da urina e avaliação da presença de espermatozoides. (arquivo pessoal)

6. Principais métodos de coleta de sêmen em Garanhões

A coleta do sêmen em equinos pode ser realizada com vagina artificial, estimulação manual da glândula com compressas térmicas, ejaculação química, eletroejaculação e pela recuperação de células espermáticas da cauda do epidídimo.

A coleta do sêmen com vagina artificial é o método tradicional mais utilizado em equinos. É uma técnica que consiste em mimetizar os eventos da cópula, simulando as condições anatômicas e térmicas do interior da vagina da égua. Basicamente, a vagina artificial é constituída por um tubo cilíndrico rígido recoberto internamente por uma mucosa de látex, com uma abertura lateral para o preenchimento do espaço interno, entre o tubo rígido e a mucosa de látex, com água a uma temperatura entre 42-45°C (LOVE, 1992).

Previamente a coleta, o garanhão é estimulado sexualmente até que alcance ereção completa e salte em uma égua em cio ou em um manequim adaptado para a coleta de sêmen. A intromissão do pênis se dá na vagina artificial e todos os movimentos de propulsão observados em monta natural também são observados durante a coleta em vagina artificial. Os garanhões apresentam boa aceitação a este método de coleta e são rapidamente condicionados a esse tipo de manejo reprodutivo. No entanto, são particularmente sensíveis a alterações de temperatura e pressão da vagina artificial no desencadeamento do processo ejaculatório (LOVE, 1992).

Uma variação da técnica de coleta por meio de vagina artificial é a coleta fracionada do sêmen. Essa técnica possibilita o fracionamento do ejaculado em três diferentes frações, de modo que a fração rica em espermatozoides seja separada da fração gelatinosa, que é majoritariamente composta por plasma seminal, proveniente das glândulas sexuais anexas. Desse modo, a coleta fracionada tem sido muito utilizada em garanhões que apresentam plasma seminal com efeitos deletérios aos espermatozoides, bem como em garanhões com vesiculite seminal (OLIVEIRA, 2015; OLIVEIRA, 2016). No entanto, assim como na coleta por meio de vagina artificial tradicional, garanhões com dificuldade em efetuar a monta também apresentam dificuldade em ejacular com essa técnica de coleta (McDONNELL, 1999).

Um método alternativo de coleta em vagina artificial é a coleta em estação, que consiste na coleta do garanhão sem o animal saltar em manequim ou égua em cio. O animal após excitação sexual e ereção completa permanece em posição quadrupedal e a vagina artificial é então introduzida no pênis do garanhão. Esse método alternativo é eficiente em casos de animais com dificuldades em efetuar a monta como ocorre em animais com alterações músculo-esqueléticas e neurológicas. No entanto, muitos garanhões são resistentes a esse tipo de manipulação, perdendo a excitação e ereção durante as tentativas de coleta. É importante ressaltar os riscos que essa técnica oferece ao profissional durante a coleta, visto que o animal estará com os quatro membros apoiados no chão, gerando uma maior possibilidade de reações negativas do animal, como coices (McDONNELL, 2005).

A estimulação manual da glândula com o auxílio de compressas quentes também tem sido um método alternativo de coleta de sêmen. As compressas são previamente aquecidas a 55 graus, sendo uma compressa posicionada na base do pênis e outra compressa recobrendo a glândula. Para que não ocorra perda do ejaculado, um saco plástico é previamente fixado ao redor da glândula sem a presença de ar no seu interior para que o plástico não se rompa durante os movimentos manuais de estimulação (McDONNELL, 1990). Essa técnica pode ser realizada tanto com o animal em estação quanto em animais efetuando a monta, de modo que alguns animais apresentam maior excitação durante a monta. É uma técnica muito utilizada em garanhões com quadro clínico relacionado a disfunção (McDONNELL, 2005).

Em equinos, contrariamente ao que ocorre em ruminantes, a técnica de eletroejaculação tem sido contra indicada, devido a diferenças marcantes no comportamento entre as espécies. Os garanhões sem nenhuma sedação apresentam baixa aceitação da técnica, com riscos de traumas tanto para os animais quanto para os operadores. As particularidades anatômicas do aparelho reprodutor de garanhões associadas ao alto nível de estresse a que essa técnica submete os animais levam a baixas taxas de sucesso na indução da ejaculação bem como a contaminação seminal por urina, inviabilizando o uso do sêmen (CARY et al., 2004). No entanto, um estudo com cavalos selvagens (*Equus ferus przewalskii*) submetidos a anestesia dissociativa previamente à eletroejaculação apresentou alta taxa de indução da ejaculação. Nenhuma das amostras seminais obtidas estavam contaminadas com urina e os parâmetros seminais se mostraram similares aos padrões da espécie, evidenciando que esta técnica pode ser uma alternativa viável, porém somente em animais anestesiados (COLLINS et al., 2006).

A técnica de colheita de sêmen diretamente da cauda do epidídimo tem se mostrado eficiente na recuperação de células espermáticas viáveis. As taxas de fertilidade de espermatozoides coletados da cauda do epidídimo não diferem dos ejaculados coletados por meio de vagina artificial, sendo uma técnica aplicável para a utilização tanto de sêmen refrigerado quanto congelado. No entanto, essa colheita só é possível após o procedimento cirúrgico de orquiectomia, sendo restrita a sua aplicação a animais com

enfermidades terminais graves, morte inesperada ou que não se tenha conseguido obter o sêmen por nenhum outro método alternativo (MONTEIRO et al., 2011).

Desse modo, a colheita de sêmen de garanhões pelo método de indução farmacológica apresenta - se como uma ferramenta auxiliar importante para a preservação do material genético de garanhões impossibilitados de efetuar a monta (CARD et al., 1997; ROWLEY et al., 1999; McDONNELL, 2001).

7. Indução farmacológica da ejaculação

A indução farmacológica da ejaculação, também conhecida como ejaculação química, é caracterizada pela obtenção do ejaculado na ausência de qualquer estimulação sexual manual do pênis. Os fármacos desencadeiam a ejaculação ao interagirem com os receptores responsáveis por desencadear a ejaculação (McDONNELL, 1992).

A coleta do sêmen pode ser realizada com o auxílio de um copo coletor acoplado a um tubo cilíndrico que possibilite o operador segurar e manejar o copo coletor a medida que o animal se movimenta (Figura 6). No entanto, a colocação de um suspensório associado a uma mucosa plástica ao redor do prepúcio é a técnica mais utilizada devido a sua maior praticidade e menor manipulação do animal (McDONNELL, 1999).

A técnica de indução farmacológica da ejaculação é indicada em casos de alterações relacionadas a incapacidade de efetuar a cópula como disfunções músculo-esqueléticas, fraturas ósseas, alterações neurológicas, baixa libido, disfunção erétil, neoplasias, paralisia e traumas penianos (CARD et al. 1997; McDONNELL; ODIAN, 1994; McDONNELL, 1999; FEARY et al. 2005).

Esse método de coleta também é muito utilizado em casos clínicos relacionados a distúrbios ejaculatórios. No entanto, em distúrbios ejaculatórios secundários a obstruções do aparelho reprodutor masculino esta técnica não apresenta aplicabilidade (McDONNELL, 1992; JOHNSTON; DeLUCA, 1998).

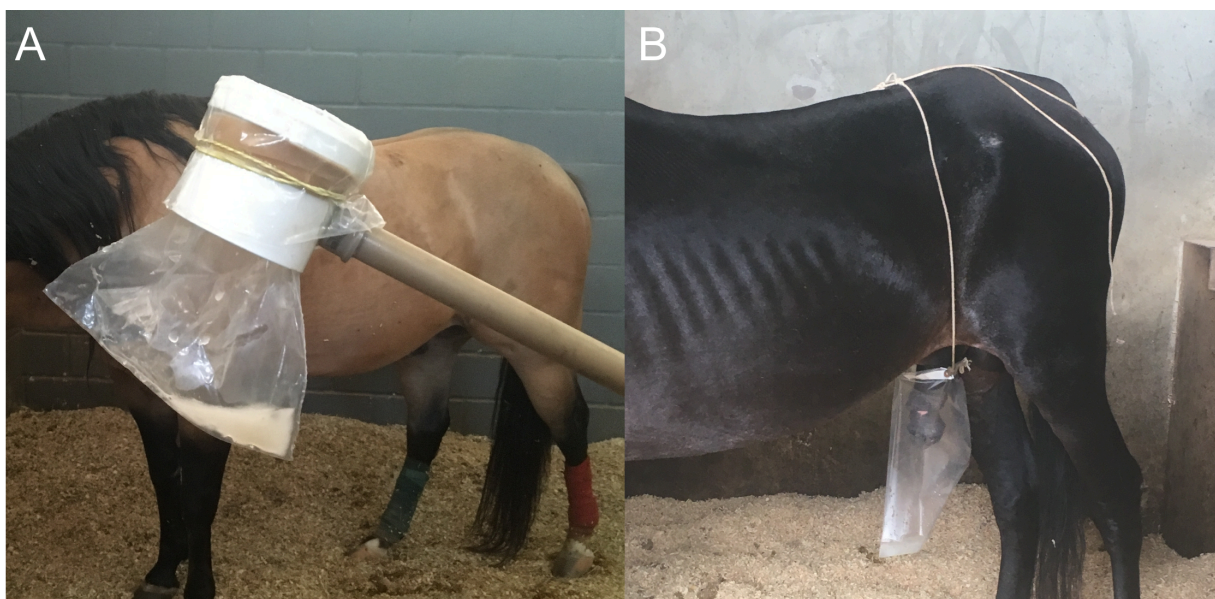


FIGURA 6 - Coleta de sêmen por meio de indução farmacológica da ejaculação. A) Utilização de copo coletor acoplado a mucosa plástica. B) Utilização de suspensório com mucosa plástica posicionada ao redor do prepúcio e amarrada ao flanco por dois cordões laterais e um cordão transpassado entre os membros pélvicos. (arquivo pessoal)

7.1. Fármacos utilizados na indução farmacológica da ejaculação

7.1.1. Cloridrato de imipramina

Os antidepressivos tricíclicos foram a primeira classe de antidepressivos formulados para humanos. Estes fármacos apresentam ação principal de inibição da recaptação de amíngas biogênicas. A imipramina atua primariamente na inibição não seletiva da recaptação de monoaminas (DeLEO; MAGNI, 1983). Desse modo, apresenta inibição mista da recaptação de noradrenalina, serotonina e, em menor proporção, dopamina. Efeitos anticolinérgicos também são observados após a administração da imipramina, devido ao antagonismo de receptores muscarínicos e histamínicos (SERRETTI; CHIESA, 2011).

As formulações comerciais da imipramina são encontradas mais comumente associadas aos sais aniônicos pamoato ou cloridrato, que apresentam equivalência terapêutica. O uso de diferentes tipos de sais são estratégias utilizadas para prolongar ou reduzir a liberação do componente ativo (SAAL; BECKER, 2013). O pamoato possui características químicas de redução da solubilidade de fármacos básicos, como a imipramina, prolongando sua ação em relação aos sais mais hidrossolúveis, como o cloridrato e

hidrocloridrato (GOULD, 1986; MITTAPELLY et al., 2016). Desse modo, a imipramina utilizada para o tratamento da depressão em humanos quando associada ao cloridrato é administrada na dose de 25 mg três vezes ao dia, enquanto na formulação que contém o pamoato pode ser administrada uma vez ao dia na dose de 75 mg (GOLDBERG; NATHAN, 1972).

A imipramina apresenta boa absorção (>95%) em ambiente alcalino quando administrada por via oral, atingindo o pico de concentração plasmática entre 1 e 3 horas após a administração (DeLEO; MAGNI, 1983). É primariamente absorvida na porção inicial do intestino delgado, com baixa ou nenhuma absorção pelo estômago, devido a alta taxa de ionização em ambientes com pH ácido. O jejum não tem influência na taxa de absorção, pico de concentração plasmática e biodisponibilidade do fármaco, podendo ser utilizada independente do momento da alimentação (SALLEE; POLLOCK, 1990).

Os antidepressivos tricíclicos são utilizados em humanos no tratamento da depressão, aspermia, ejaculação retrógrada e incontinência urinária (KELLY; NEEDLE, 1979; ARAFA; EITABIE, 2008).

Em garanhões, a imipramina tem sido utilizada na indução farmacológica da ejaculação e no tratamento de disfunções ejaculatórias e eréteis. Garanhões com histórico de urospermia apresentam melhora após o tratamento com cloridrato de imipramina (0,8 mg/kg/vo) 4 horas previamente a coleta do sêmen com vagina artificial (TURNER et al. 1995). Do mesmo modo, o tratamento com cloridrato de imipramina (1,76 mg/kg/v.o a cada 12h) também mostrou-se eficiente no tratamento da ejaculação retrógrada nesta espécie (BRINSKO, 2001).

Em estudo realizado por McDonnell et al. (1987), o cloridrato de imipramina administrado em baixas doses (100 a 600 mg iv), 2 vezes ao dia, induziu masturbação e ereção em equinos castrados e não castrados. Em garanhão com déficit de ereção a utilização desse protocolo provocou ejaculação espontânea e, posteriormente, conseguiu-se sucessivas coletas de sêmen com vagina artificial, observando-se ereção peniana completa.

Embora as vias de ação da imipramina não estejam totalmente esclarecidas, acredita-se que seus metabólitos atuem diretamente na promoção da atividade alfa adrenérgica, devido a inibição da recaptação de noradrenalina na fenda sináptica. Do mesmo modo, o efeito doparminérgico da imipramina está relacionado ao desencadeamento da ereção e masturbação (MCDONNELL, 1992).

7.1.2. Agonistas alfa adrenérgicos

7.1.2.1. Cloridrato de xilazina

Dentre os fármacos pertencentes a classe de agonistas alfa adrenérgicos, a xilazina apresenta uma ampla utilização clínica na medicina veterinária. É bastante utilizada em ruminantes, caninos, equinos e em animais silvestres (WAGNER et al., 1991; CULLEM et al., 1999; KASTER, 2006; CASTELO; SILVA et al., 2015; ABDEL-HADY et al., 2017). A xilazina é amplamente utilizada em equinos em procedimentos que necessitam sedação, contenção química e analgesia (KNICK, 2017).

Em equinos, quando administrada por via intravenosa, máxima sedação e analgesia ocorrem em média entre 4 e 10 minutos, com tempo de máxima concentração plasmática em torno de 4 minutos e com meia vida plasmática média de 32 minutos, variando entre 23 e 38 minutos (KNICK et al., 2017). A metabolização da xilazina ocorre por biotransformação hepática e sua eliminação é exclusivamente por via renal (GARCIA-VILLAR et al., 1981). A metabolização total da xilazina ocorre em 16 horas após administração intravenosa, no entanto, seu metabólito 4-OH xilazina permanece em níveis elevados na circulação até 24 horas, podendo estar presente em concentrações mínimas por até 96 horas pós aplicação (KNICK et al., 2017).

A xilazina, embora possua alta seletividade para receptores alfa 2 adrenérgicos, apresenta também ação em receptores alfa 1 adrenérgicos, com relação de seletividade entre receptores α -2: α -1 de 160:1 (McGRATH, 1983).

Schwartz e Clark (1998) compararam a afinidade dos fármacos agonistas alfa adrenérgicos detomidina, medetomidina e xilazina frente a quatro diferentes subtipos de receptores alfa 2 agonistas. Observou-se uma

alta afinidade dos fármacos detomidina e medetomidina aos subtipos de receptores alfa 2 em relação ao fármaco xilazina. Evidenciando assim sua menor atuação em receptores alfa 2 adrenérgicos e sua função mista em ambos os receptores alfa adrenérgicos.

7.1.2.2. Cloridrato de detomidina

O cloridrato de detomidina é um potente agonista α_2 adrenérgico amplamente utilizado na medicina equina devido à sua alta eficácia como agente sedativo e sua ação coadjuvante como agente analgésico (STANLEY et al., 1992; CHAMBERS et al., 1993). Apresenta potência cerca de 50 vezes superior ao Cloridrato de Xilazina (CHUI et al., 1992), e, devido a suas características lipofílicas, apresenta rápida absorção e alta afinidade pelo sistema nervoso central (STANLEY et al., 1992).

É muito utilizada como medicação pré-anestésica e em procedimentos cirúrgicos em posição quadrupedal. As principais alterações clínicas observadas durante o uso de detomidina são abaixamento de cabeça, ataxia, ptose labial e redução da motilidade intestinal (MUIR; HUBBELL, 1991; SPINOSA et al., 2014). No sistema cardiovascular são observados bradicardia, bloqueio atrioventricular e hipertensão seguida por hipotensão (YAMASHITA et al., 2000).

Após a administração intravenosa de detomidina, a concentração sérica máxima atinge o pico em cerca de 2 minutos e meia-vida em 30 minutos (GRIMSRUM et al., 2009). Estudo comparativo realizado por MAMA (2009) observou máxima concentração plasmática em 1.5 minutos e 1.5 horas após administração endovenosa e intramuscular, respectivamente, do cloridrato de detomidina. No entanto, a concentração máxima plasmática após administração intravenosa foi 15 vezes superior a concentração máxima atingida pela administração intramuscular. O máximo grau de sedação, caracterizado por máximo abaixamento de cabeça, foi observado após 10 minutos da aplicação intravenosa e 60 minutos da aplicação intramuscular.

Poucos estudos foram realizados com o uso do cloridrato de detomidina na indução farmacológica da ejaculação. Mrácková et al. (2013) obtiveram 20% de sucesso em experimento realizados em jumentos. Rowley et al. (1999) obteve 50% de sucesso em duas tentativas de indução farmacológica da ejaculação em garanhão.

7.1.3. Ocitocina

A ocitocina é um hormônio neuropeptídeo com funções fisiológicas no aparelho reprodutor masculino ainda não totalmente elucidadas. É sintetizada primariamente a nível cerebral pelo hipotálamo, armazenada e liberada pela glândula hipófise e, em menor proporção, é produzida pelos testículos e glândulas anexas (FILIPPI et al., 2002b).

Tem-se evidenciado receptores para ocitocina em todo o aparelho reprodutor masculino de coelhos, ratos e humanos. Nestas espécies, demonstrou - se a presença destes receptores inclusive nos corpos cavernosos do pênis, sugerindo a participação da ocitocina no mecanismo de manutenção da contração de musculatura lisa durante o estado de não ereção peniana (ZHANG et al., 2005).

A ocitocina também foi relacionada ao desencadeamento do processo ejaculatório, por vias ainda não totalmente esclarecidas (FILIPPI et al., 2002b, ZHANG et al., 2005). Assim como o SNA apresenta um papel essencial no processo ejaculatório, os hormônios estrógeno e ocitocina parecem participar ativamente do processo de ejaculação através da indução de contrações rítmicas em epidídimo e túbulos seminíferos (VIGNOZZI et al., 2008).

Em estudo realizado por Veronesi et al (2010), foi observada significativa elevação da concentração sérica de ocitocina em garanhões, quando comparados os momentos imediatamente pré e pós-ejaculação ($p < 0.001$). Os valores de ocitocina plasmática elevaram-se de aproximadamente 15 pmol/L para cerca de 60 pmol/L no momento pós-ejaculação, e retornaram aos níveis plasmáticos encontrados antes da ejaculação rapidamente após finalizado o processo ejaculatório.

Elevações no número de espermatozoides totais ejaculados foram observados após a administração de ocitocina exógena em ratos, coelhos, ovinos, bovinos e equinos (WATSON et al., 1999). Acredita-se que esse efeito esteja intimamente relacionado a um incremento nas contrações de musculatura lisa na cauda dos epidídimos, aumentando o trânsito espermático. A administração exógena de ocitocina também parece facilitar a fase de emissão seminal por meio da intensificação de contrações em musculatura lisa presente por todo o aparelho reprodutor masculino (FILIPPI et al., 2002b).

Filippi et al. (2002b) observaram diferenças significativas entre as marcações de receptores de ocitocina presentes em cabeça e cauda do epidídimo de coelhos e humanos. A região da cabeça apresentou marcações em concentrações similares entre células epiteliais e musculatura lisa. No entanto, a cauda do epidídimo apresentou marcações intensas nas camadas de músculos lisos e poucas marcações em células epiteliais, evidenciando assim uma participação mais ativa da cauda do epidídimo nos processos de contração muscular mediadas pela ocitocina.

Em equinos, a ocitocina tem sido amplamente utilizada no manejo de éguas para induzir contrações na musculatura do endométrio e, conseqüentemente, auxiliar na limpeza uterina (REBORDÃO, 2017). Já em garanhões, a ocitocina tem apresentado bons resultados no tratamento de obstrução, parcial ou total, de ampola seminal. O uso terapêutico baseia-se na aplicação endovenosa (10-20 UI) 10 minutos previamente a coleta do animal. Acredita-se que o incremento nas contrações de musculatura lisa do trato reprodutivo causadas pela ocitocina auxilie na eliminação da massa de espermatozoides e líquidos que podem se formar e ocluir o lúmen da ampola seminal (McDONNELL, 1992).

7.1.4. Prostaglandina F 2 alfa (PGF₂α)

As prostaglandinas estão presentes em praticamente todos os tecidos do organismo e apresentam funções biológicas diferentes a depender do seu subtipo. A PGF₂α apresenta funções relacionadas a contrações de musculatura lisa, com participação importante na contração bronquial dos pulmões e do aparelho reprodutor (SPINOSA et al., 2014).

Em bovinos e equinos tem sido amplamente utilizada para a indução da luteólise em fêmeas (SANTOS et al., 2002; REBORDÃO, 2017). Tem sido relacionada a saúde uterina, auxiliando na eliminação dos envoltórios fetais no pós-parto imediato por meio de contrações no endométrio, prevenindo a retenção de placenta (SANTOS et al., 2002).

Potentes contrações do aparelho reprodutor masculino foram observadas em humanos, ratos e coelhos após a aplicação de PGF2 α (FARR et al., 1980; YAMAMOTO et al., 1987; SUDOH et al., 1997). Em equinos e suínos a administração de PGF2 α intramuscular previamente a coleta resultou em aumento do interesse sexual, melhora da ereção e diminuição do tempo até a ejaculação. Também observou-se um aumento da fração gel do ejaculado, com aumento do volume total e diminuição da concentração espermática (KREIDER et al., 1981).

Estudo realizado por Veronesi et al. (2010) evidenciou um significativo aumento nas concentrações plasmáticas de PGF2 α durante a ereção e novamente um aumento na concentração durante a ejaculação em garanhões. Os valores permaneceram altos por até 20 minutos após a ejaculação.

McDonnell (1992) ao administrar PGF2 α (0.01-0.15/mg/kg/i.m) em 8 garanhões observou uma taxa de ejaculação em 75% dos animais. No entanto, foram observados severos efeitos adversos associados a desconforto abdominal, sudorese intensa e contaminação seminal com urina. Os ejaculados também apresentaram alta quantidade de fração gel, associada a diminuição da concentração espermática.

8. Protocolos de indução farmacológica da ejaculação

Estudos anteriormente desenvolvidos utilizando xilazina, detomidina e associações de imipramina e xilazina apresentaram alta variabilidade de resultados, com resultados variando entre 27% e 68% de sucesso na indução da ejaculação (McDONNELL; ODIAN, 1993; McDONNELL; TURNER, 1994; JONHSON et al., 1998; ROWLEY et al., 1999; DUTRA, 2000; McDONNELL, 2001; MRACKOVA et al., 2013).

Os melhores resultados foram alcançados por McDonnell (2001) com 68% de sucesso quando administrado Cloridrato de Imipramina (3/mg/kg/v.o) associado a Cloridrato de Xilazina (0,66/mg/kg/i.v) e McDonnell e Love (1991) com taxa de ejaculação de 39% após a utilização de cloridrato de xilazina com estímulo sexual previamente a aplicação de xilazina (0,3/mg/kg/i.v). Rowley et al (1999) alcançou 50% de sucesso após a administração de cloridrato de detomidina (0,02/mg/kg/i.v) em duas aplicações utilizando o mesmo ganhão.

Em ganhão com fratura óssea, a clomipramina (2,2/mg/kg/i.v), um antidepressivo tricíclico semelhante a imipramina, provocou masturbação e ereção peniana 7 minutos após sua administração. O cloridrato de xilazina (0,5/mg/kg/i.v) foi administrado 35 minutos após a aplicação de clomipramina, e após 2 minutos o animal ejaculou um volume total de 4 mL e concentração de 1 bilhão de espermatozoides/mL (TURNER et al., 1995).

A administração dos fármacos imipramina e xilazina aparentemente intensificam contrações em musculatura lisa de ampolas e suprimem contrações em glândulas acessórias, resultando em diminuição do volume total do ejaculado, aumento da concentração espermática e redução do pH seminal (McDONNELL; LOVE, 1991; McDONNELL; TURNER, 1994).

Mrácková et al. (2013) compararam, em jumentos, o uso de dois diferentes protocolos utilizando cloridrato de detomidina (0,02/mg/kg/i.m) e cloridrato de xilazina (0,66/mg/kg/i.v). O protocolo baseado na administração de cloridrato de detomidina apresentou uma eficácia de 20%. A administração de cloridrato de xilazina não se mostrou eficaz em nenhum dos animais testados (n=5), fato ocorrido provavelmente, segundo os autores, devido à ausência de éguas ou jumentas em estro no momento da indução, bem como o estresse ao qual esses animais foram submetidos, visto que muitos não eram acostumados a nenhum tipo de manipulação.

Em geral, os parâmetros seminais de ejaculados provenientes de indução farmacológica variam dependendo dos fármacos utilizados (McDONNELL, 2001). Protocolos utilizando a associação de imipramina com xilazina resultaram em ejaculados com menor volume total, maior concentração/ml e maior número de espermatozoides por ejaculado (MCDONNELL, 1991, MCDONNELL;ODIAN, 1994; MCDONNELL; TURNER,

1994, CARD et al., 1997, JOHNSTON and DeLUCA, 1998, DUTRA, 2000).

A indução da ejaculação utilizando detomidina também resultou em ejaculados com menor volume total, maior concentração e maior número de espermatozoides no ejaculado (ROWLEY et al., 1999, MRACKOVA et al., 2013). Por outro lado, a utilização somente de xilazina resultou em parâmetros seminais similares aos observados em coletas por meio de vagina artificial (McDONNELL;LOVE, 1992).

A avaliação da morfologia espermática não resultou em alterações significativas entre ejaculados provenientes de indução farmacológica e ejaculados obtidos por coleta em vagina artificial, independente do protocolo utilizado (CARD et al., 1997, DUTRA, 2000; NAOMI et al., 2012; CORREA;BOZZO, 2016). Do mesmo modo, a avaliação das motilidades total e progressiva não diferiram quando comparados os ejaculados obtidos por meio de coleta em vagina artificial e por meio de protocolos de indução farmacológica da ejaculação (MCDONNELL, 1991, MCDONNELL;ODIAN, 1994; MCDONNELL; TURNER, 1994, CARD et al., 1997, JOHNSTON and DeLUCA, 1998, DUTRA, 2000; CORREA;BOZZO, 2016).

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HADY, A. A. A., ABDELBASSET, K. M., & SOLIMAN, A. S. Comparative experimental study on two designed intravenous anaesthetic combinations in dogs. **EXCLI journal**, n. 16, p. 770, 2017.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 6, p. 204-209, 2009.
- AMANN, R. P. Functional anatomy of the adult male. In: Mckinnon, A.O.; Voss J.L (eds): **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 645-663, 1993.
- AMANN, R. Functional Anatomy of the Adult Male. In: McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Iowa: Wiley - Blackwell. Cap. 95. p. 867-879, 2011.
- ANDERSSON, K.E. Neurophysiology/pharmacology of erection. **International Journal of impotence research**, v. 13, n. 3, p. 8, 2001.
- ARAFA, M., EL TABIE, O. Medical treatment of retrograde ejaculation in diabetic patients: a hope for spontaneous pregnancy. **The journal of sexual medicine**, v. 5, n. 1, p. 194-198, 2008.
- BALL, B. A. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 650-665, 2008.
- BACCARIN, R. Y. A. SILVA, L. C. L., BELLI, C. B., FERNANDES, W. R. ZOPPA, A. L. A survey on equine neoplasias over a 15-year period in a veterinary hospital. **Brazilian Journal of Veterinary Animal Science**, v. 48, p. 439-445, 2011.
- BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, p. 205-218, 1992.
- BRINSKO, S.P. "Retrograde ejaculation in a stallion." **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 4, p. 551-553, 2001.
- CARD, C.E., MANNING, S.T. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled horse. **Can. Vet, J**, v. 38, p. 171-174, 1997.

CARY, J.A., MADILL, S., FARNSWORTH, K., HAYNA, J.T., DUOOS, L., FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. **Can Vet J.** v. 45, p. 35-41, 2004.

CASTELO, T. S., SILVA, A. R. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 208-213, 2015.

CHACUR, M.G.M., FACHINI, B.A., YAMASAKI, L., BASSO, K., SANCHES, O.C., PESSOA, M. V. Carcinoma das células escamosas no prepúcio com invasão vertebral em equino. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1383-1388, 2014.

CHAMBERS, J.P., LIVINGSTON, A., WATERMAN, A.E. Analgesic effects of detomidine in thoroughbred horses with chronic tendon injury. **Research in Veterinary Science**. v. 54, p. 52-56, 1993.

CHUZEL, F., CLARK, A.M., AVALLET, O., SAEZ, J.M. Transcriptional regulation of lutropin/human choriogonadotropin receptor and three enzymes of steroidogenesis by growth factors in cultured pig Leydig cells. **European Journal of Biochemistry**. n. 239, p. 8–16, 1996.

COLLINS, C. W., SONGSASEN, N., MONFORT, S. L., BUSH, M., WOLFE, B., JAMES, S. B., ... & PUKAZHENTHI, B. S. Seminal traits in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*) following electroejaculation. In **Animal Reproduction Science** (Vol. 94, No. 1-4, pp. 46-49). Elsevier, 2006.

CORBIN, J.D., SHARRON, H.F, WEBB, J.D. "Phosphodiesterase type 5 as a pharmacologic target in erectile dysfunction." **Urology**, v. 60, n.2, p. 4-11, 2002.

CORONA, G., JANNINI, E.A., VIGNOZZI, L., RASTRELLI, G., MAGGI, M. The hormonal control of ejaculation. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 9, p. 508-519, 2012.

CLEMENT, P., GIULIANO, F. Physiology and Pharmacology of Ejaculation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 64, p. 121 - 129, 2016.

CULLEM, L.K. Xylazine and medetomidina in small animals: these drugs should be used carefully. **Australian Veterinary Journal**. v.77, n. 11, p. 722-723,1999.

DIAS, M. C., ARAUJO, M.S., KIEVITSBOSCH, T.,PRESTES, N. C. Penectomia em equino com carcinoma de células escamosas. **Enciclopédia Biosfera**,

Centro Científico Conhecer, v. 9, n. 17, p. 2018-2027, 2013.

DEAH, R.C., LUE, T.F. Physiology of penile erection and pathophysiology of erectile dysfunction. **The Urologic clinics of North America**, v. 32, n. 4, p. 379, 2005.

DeLEO, D., MAGNI, G. Sexual side effects of antidepressant drugs. **Psychosomatics**, v. 24, n. 12, p. 1076-1078, 1983.

DUTRA, F. O. **Indução da ejaculação em equinos através da utilização da imipramina e de sua associação com xilazina**. 2000. 39 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

EURIDES, D., MAZZANTI, A., GONCALVES, G.F., BELETTI, M.E., FIORAVANTE, M.C.S., SILVA, L. A.F., TRONCOSO-NETO, N.S., HARDT, G.G. Surgical correction of equine acquired phimosis. **Veterinária Notícias**, v. 3, p. 43-49, 1997.

ESTRADA, A., SAMPER, J. C., LILLICH, J. D., RATHI, R. R., BRAULT, L. S., ALBRECHT, B. B., ... & SENNE, E. M. Azoospermia associated with bilateral segmental aplasia of the ductus deferens in a stallion. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, p. 1740-1743, 2003.

FARR, C.H., ELLIS, L.C. In-vitro contractility of rat seminiferous tubules in response to prostaglandins, cyclic GMP, testosterone and 2,4'-dibromoacetophenone. **Journal of Reprod and Fertil**, v. 58, p. 37– 42, 1980.

FEARY, D. J., MOFFETT P. D., BRUEMMER, J. E., SOUTHWOOD, L., MCCUE, P., NISWENDER, K. D., DICKINSON, C., TRAUB-DARGATZ, J. Chemical ejaculation and cryopreservation of semen from a breeding stallion with paraphimosis secondary to priapism and haemorrhagic colitis. Case Report. **Equine vet. Educ**, v. 17, p. 299-304, 2005.

FILIPPI, S., LUCONI, M., GRANCHI, S., VIGNOZZI, L., BETTUZZI, S., TOZZI P., LEDDA, F., FORTI, G., MAGGI M. Estrogens, but not androgens, regulate expression and functional activity of oxytocin receptor in rabbit epididymis. **Endocrinology**, v. 143, p. 4271–80, 2002a.

FILIPPI, S., VANNELLI, G.B., GRANCHI, S., LUCONI, M., CRESCIOLI, C., MANCINA, R. Identification, localization and functional activity of oxytocin

- receptors in epididymis. **Mol Cell Endocrinol**, v.193, p. 89–100, 2002b.
- GARCIA-VILLAR, R., TOUTAIN, P.L., ALVINERIE, M., RUCKEBUSCH, Y. The pharmacokinetics of xylazine hydrochloride: an interspecific study. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 87-92, 1983.
- GERSTENBERG, T.C, LEVIN, R. J, WAGNER, G. Erection and ejaculation in man. Assessment of the electromyographic activity of the bulbo- cavernosus and ischiocavernosus muscles. **Br J Urol**, v. 65:p. 395– 402, 1990.
- GOLDBERG, H.L., NATHAN, L. A double-blind study of tofranil pamoate vs. tofranil hydrochloride. **Psychosomatics**, v. 13, n. 2, p. 131-134, 1972.
- GOULD, P.L. Salt selection for basic drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 33, n. 1-3, p. 201-217, 1986.
- JOHNSTON, P. F., DELUCA, J. L. Chemical ejaculation of stallions after administration of oral imipramine followed by intravenous xylazine. **Proc. AAEP**, v. 43, p. 59–62, 1998.
- KASTER, S.B.R. A2-agonists in sheep: a review. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 33, n. 1, p. 79-96, 2006.
- KELLY, M.E., NEEDLE, M.A. Imipramine for aspermia after lymphadenectomy. **Urology**, v. 13, n. 4, p. 414-415, 1979.
- KREIDER, J.L., OGG, W. L., TURNER, J. W. Influence of prostaglandin F2 α on sperm production and seminal characteristics of the stallion. **Prostaglandins**, v. 22, n. 6, p. 903-913, 1981.
- KNYCH, H.K., STANLEY, S.D., McKEMIE, D.S., ARTHUR, R.M., KASS, P. H. Pharmacokinetic and pharmacodynamics of xylazine administered to exercised thoroughbred horses. **Drug testing and analysis**, v. 9, n. 5, p. 713-720, 2017.
- KOSINIAK K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. **Journal of reproduction and fertility. Suppl**, n. 23, p. 59-61, 1975.
- LOVE, C.C. Semen collection techniques. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 111-128, 1992.
- MALPAUX, B., MIGAUD, M., TRICOIRE, H., CHEMINEAU, P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. **Journal of Biology Rhythms**, n. 16, p. 336–347, 2001.

- McDONNELL, S.M. Reproductive behavior of the stallion. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 2, n. 3, p. 535-555, 1986.
- McDONNELL, S.M, GARCIA, M.C, KENNEY, R.M. Imipramine-induced erection, masturbation, and ejaculation in male horses. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 27, p.187-191, 1987.
- McDONNELL, S.M. Masturbation in equids. **Proceedings, American Association of Equine Practitioners**, p. 35:567, 1990.
- MCDONNELL, S. M.; LOVE, C. C. Manual stimulation collection of semen from stallions: training time, sexual behavior and semen. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1201-1210, 1990.
- McDONNELL, S.M., LOVE, C.C. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. **Theriogenology**, v. 36, p. 73–76, 1991.
- McDONNELL, S.M. Ejaculation: physiology and dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 57-70, 1992.
- McDONNELL, S.M. Normal and abnormal sexual behavior. **Vet Clin North Am Equine Pract**, n. 8, p. 71-89, 1992.
- McDONNELL, S.M., TURNER, R.M. O. Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculates of pony stallions. **Theriogenology**, v. 42, p. 475–481, 1994.
- McDONNELL, S.M., ODIAN, M.J. Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. **Theriogenology**, v. 41, p. 1005–1010, 1994.
- McDONNELL, S.M. Libido, erection, and ejaculatory dysfunction in stallions. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, 1999.
- MCDONNELL, S.M. "Reproductive behavior of stallions and mares: comparison of free-running and domestic in-hand breeding." **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 211-219, 2000.
- McDONNELL, S.M. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 68 p. 153–159, 2001.
- MCDONNELL, S.M. Techniques for Extending the Breeding Career of Aging

and Disabled Stallions. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v.4, p. 269-76, 2005.

MENZIES-GOW, N. Endocrinological aspects of the pathophysiology of equine laminitis. ***Equine Veterinary Journal***, v. **44**, p. 735–737, 2012.

MIROSLAVA MRACKOVA, D. V. M; BLAHOVA, Z; MARKETA SEDLINSKA, D. V. M. The Reliability of two different protocols for pharmacologically induced ejaculation in donkeys (*Equus asinus*). ***Journal of Equine Veterinary Science***, v. 33, p. 1121–1123, 2013.

MITTAPELLY, N., RACHUMALLU, R., PANDEY, G., SHARMA, S., ARYA, A., BHATTA, R. S., & MISHRA, P. R. Investigation of salt formation between memantine and pamoic acid: Its exploitation in nanocrystalline form as long acting injection. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 101, p. 62-71, 2016.

McGRATH, J.C. The variety of vascular α -adrenoceptors. ***Trends in Pharmacological Sciences***, n. 4, p. 14-18, 1983.

MONTEIRO, G.A., PAPA, F.O., ZAHN, F.S., DELLAQUA, J.A., MELO, C.M., MAZIERO, R.R.D.,GUASTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. ***Animal reproduction science***, v. 127, n. 3, p. 197-201, 2011.

OLIVEIRA, S. N.; ARAUJO, E. A. B.; CHAVES-SILVA, L. F. M.; ANDRADE Jr, L. R. P.; DALANEZI, F. M.; PINTO, B. M.; CARNEIRO, J. A. M.; DELLAQUA Jr., J. A.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Eficiência de uma nova técnica de coleta de sêmen para diagnóstico e controle de piospermia em garanhões: Relato de caso. In: XVI Conferência Anual da ABRAVEQ. Águas de Lindóia. XVI. p. 284-284. 2015.

OLIVEIRA,S.N.D. (2016). Efeito da colheita fracionada sobre a cinética e viabilidade espermáticas do sêmen refrigerado e congelado de garanhões. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo.

PUPPO, V., PUPPO, G. Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease. ***Clinical Anatomy***,

v, 29, p. 111-119, 2016.

REBORDÃO, M. R. Endometrial prostaglandin synthases, ovarian steroids, and oxytocin receptors in mares with oxytocin-induced luteal maintenance.

Theriogenology, v. 87, p. 193-204, 2017.

ROSER, J.F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions.

Animal reproduction science, v. 68, n. 3, p. 139-151, 2001.

ROSER, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems, **Animal reproduction science**, v. 107, n. 3, p. 179-196, 2008.

ROWLEY, D.D., LOCK, T.F., SHIPLEY, C.F. Fertility of detomidine HCl induced ex copula ejaculated stallion semen. **Proc. AAEP**, v. 45, p. 221–223, 1999.

SAAL, C., BECKER, A. Pharmaceutical salts: a summary on doses of salt formers from the Orange Book. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 4, p. 614-623, 2013.

SALLEE, F.R., POLLOCK, B.G. Clinical pharmacokinetics of imipramine and desipramine. **Clinical pharmacokinetics**, v. 18, n. 5, p. 346-364, 1990.

SANTOS, R. M., VASCONCELOS, J. L. M., SOUZA, A. H., MENEGHETTI, M., & FERREIRA, J. N. Efeito da aplicação de prostaglandina (PGF_{2a}) no pós-parto imediato sobre a incidência de retenção de placenta em vacas de leite.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 54, p. 29-34, 2002.

SERRETTI, A., CHIESA, A. (2011). Sexual side effects of pharmacological treatment of psychiatric diseases. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 89(1), 142-147.

STAHLBAUM, CATHI, C., KATHERINE, A., HOUP. The role of the flehmen response in the behavioral repertoire of the stallion. **Physiology & behavior**, v. 45, n. 6, p. 1207-1214, 1989.

SHARP, D.C., CLEAVER, B.D. Melatonin. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds.), **Equine Reproduction**. Lea & Febinger, Philadelphia, p. 100–108, 1993.

SHARPE, R.M., COOGAN, D.G., COOPER, I., Factors determining whether the direct effects of an LHRH agonist on Leydig cell function in vivo are stimulatory or inhibitory. **Mol. Cell. Endocrinol.** n. 32, p. 57–71, 1983.

SISSON, S.. Aparelho Urogenital do Equino. In: GETTY, Robert. **Anatomia dos Animais Domésticos**. 5.ed. Iowa: Guanabara Koogan. Cap. 20. p. 491-514, 1986.

SPINOSA, H.P.S., GORNIK, S.L. Tranquilizantes, Antidepressivos, Agonistas de α 2- Adrenoceptores e Relaxante muscular de Ação Central. In: SPINOSA, H.P.S., GORNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p, 166, 2014.

SUDOH, K., INAGAKI, O., HONDA, K. Responsiveness of smooth muscle in the lower urinary tract of rabbits to various agonists. **Gen Pharmacol**, v. 25, p. 629–31, 1997.

THACKARE, H., NICHOLSON, H.D., WHITTINGTON, K. Oxytocin—its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. **Human Reproduction Update**, n. 12, p. 437–448, 2006.

TRAISH, A., KIM, N.N., MORELAND, R.B., GOLDSTEIN, I. Role of alpha adrenergic receptors in erectile function. **International journal of impotence research**, v. 12, n.1, p. 48, 2000.

TISCHNER, M., KOSINIAK, K., BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 329-335, 1974.

TURNER, R.O., LOVE, C.C., MCDONNELL, S.M., SWEENEY, R.W., TWITCHELL, E.D., HABECKER, P.L., KENNEY, R.M. Use of imipramine hydrochloride for treatment of urospermia in a stallion with a dysfunctional bladder. **Journal-American Veterinary Medical Association**, v. 20, n. 7, p. 1602-1606, 1995.

TURNER, R.M.O., MCDONNELL, S.M. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 1-10, 2003.

WAGNER, A.E., MUIR, W.W., HINCHCLIFF, K.W. Cardiovascular effects of xylazine and detomidine in horses. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, n. 5, p. 651-657, 1991.

VIGNOZZI, L., FILIPPI, S., MORELLI, A., LUCONI, M., JANNINI, E., FORTI, G., MAGGI, M. Continuing Medical Education: Regulation of Epididymal

Contractility During Semen Emission, the First Part of the Ejaculatory Process: A Role for Estrogen (CME). **The journal of sexual medicine**, v. 5, n. 9, p. 2010-2016, 2008.

VILLANI, M., CAIROLI, F., KINDAHL, H., GALEATI, G., FAUSTINI, M., CARLUCCIO, A., VERONESI, M. C. Effects of Mating on Plasma Concentrations of Testosterone, Cortisol, Oestrone Sulphate and 15-Ketodihydro-PGF₂α in Stallions. **Reproduction in domestic animals**, 41(6), 544-548, 2006.

VERONESI, M.C., TOSI, U., VILLANI, M., GOVONI, N., FAUSTINI, M., KINDAHL, H., MADEJ, A., CARLUCCIO, A. Oxytocin, vasopressin, prostaglandin F_{2a}, luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate, and

cortisol plasma concentrations after sexual stimulation in stallions. **Theriogenology**, v. 73, p. 460–467, 2010.

WATSON, E.D.; NIKOLAKOPOULOS, E.; GILBERT, C.; GOODE, J. Oxytocin in the semen and gonads of the stallion. **Theriogenology**, v. 51, p. 855-65, 1999.

YAMAMOTO, M., HASHIMOTO, J., TAKABA, H., MIYAKE, K. Response of the isolated human seminiferous tubule to prostaglandins F₁ alpha, F₂ alpha, E₁ and E₂. **Journal of Urology**, v. 137, p. 345–8, 1987.

YAMASHITA, K., TSUBAKISHITA, S., FUTAOK, S., UEDA, I., HAMAGUSHI, H., SENO, T., KATOH, S., IZUMISAWA, Y., KOTANI, T., MUIR, W.W. Cardiovascular effects of medetomidine, detomidine and xylazine in horses. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 62, n. 10, p. 1025-1032, 2000.

YANG, C.C., JIANG, X. Clinical autonomic neurophysiology and the male sexual response: an overview. **The journal of sexual medicine**, v. 6, n. 3, p. 221-228, 2009.

ZHANG, X.H., FILIPPI, S., VIGNOZZI, L., MORELLI, A., MANCINA, R., LUCONI, M., MAGGI, M. Identification, localization and functional in vitro and in vivo activity of oxytocin receptor in the rat penis. **Journal of endocrinology**, v. 184, n. 3, p. 567-576, 2005.

ZHONG, H., MINNEMAN, K.P. Alpha1-adrenoceptor subtypes. **European journal of pharmacology**, v. 375, n. 3, p. 261-76, 1999.

ZIRKIN, B.R., AWONIYI, C., GRISWOLD, M.D., RUSSELL, L.D., SHARPE, R.
Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of Andrology**, n. 15, v.
273–276, 1994.

OBJETIVOS

Em vista do exposto, os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a eficiência de diferentes protocolos na indução da ejaculação de diferentes protocolos de administração oral de imipramina seguida por administração intravenosa de detomidina, xilazina e ocitocina, isoladamente, bem como da associação dos fármacos;
- Avaliar a eficiência da ocitocina quando adicionada aos protocolos de indução farmacológica da ejaculação;
- Comparar os parâmetros seminais de, volume total do ejaculado, volume livre de gel, concentração espermática, número de espermatozoides totais do ejaculado, cinética e morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, produção de espécies reativas de oxigênio e teor de óxido nítrico nos ejaculados obtidos por vagina artificial e por indução farmacológica.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais retornará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

CAPÍTULO 2

ARTIGO I**SUCCESSFUL PROTOCOLS USING DETOMIDINE AND OXYTOCIN FOR PHARMACOLOGICALLY-INDUCED EJACULATION IN STALLION¹**

^aDepartment of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brazil

*Corresponding author. Tel.: +55 34 99927-2204.

E-mail address: thaismscavalero@gmail.com.br (T.M.S. CAVALERO).

¹ Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2016

ABSTRACT

The aims of the study were: 1) Compare the efficiency of different protocols to induce ex copula ejaculation when detomidine and oxytocin was added to the protocols; 2) Compare seminal parameters between in copula and ex copula ejaculates; We evaluated the nine protocols to ex copula ejaculation: X - xylazine (0.66mg/kg/i.v); XO - xylazine + oxytocin (20UI/i.v); IX - imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66mg/kg/i.v); IXO - imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66 mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI); D - detomidine (0.02mg/kg/i.v); DO - detomidine (0.02mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI/i.v); ID - imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v); IDO- imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v) + oxytocin (20 UI/i.v); IO- imipramine (3mg/kg/v.o) + oxytocin (20 UI/i.v). Four young stallions (2-3 y old) and 12 sexually mature stallions (6 to 26 y old) were each submitted to 2 treatment trials conducted at 3-day intervals. Induced ejaculates were collected into a plastic bag and compared with in copula ejaculates. None of the 4 young stallions ejaculated and 9 of the 12 mature stallions responded. Stallions that responded to xylazine did not respond to detomidine treatments. Two stallions responded to X and XO while 4 mature stallions responded to IX and IXO. One stallion respond to DO while 5 stallions responded to IDO. Erection occurred in 5 stallions and no erection and masturbation were observed in protocols without imipramine. The induced ejaculates obtained in DO and IDO had significantly ($P<0.05$) lower total volume, lower free-gel volume and higher concentration, with similar ($P>0.05$) total number of spermatozoa, membrane integrity, sperm kinetics and morphology compared to in copula ejaculates and xylazine protocols. The semen characteristics suggests decreased accessory glands fluids in protocols DO and IDO, probably resulting from the use of oxytocin, which increase the epididymal tail contraction. Thus, oxytocin appears to play a role to induce ejaculation when associated with detomidine, but not when associated with xylazine.

Keywords: imipramine, detomidine, xylazine, semen, ejaculatory disorders, equine.

1. Introduction

Several physical, neurological and comportamental disorders such as lameness, physical trauma, equine protozoal myeloencephalitis, ejaculatory disorders, erectile dysfunctions and penile tumors can prevent semen collection for traditional methods [1-6]. Thus, pharmacological protocols has been used clinically to induce ejaculation in stallions unable to ejaculate in the traditional methods of collection.

In general, the pharmacological or chemical ejaculation protocols includes drugs which mimetic the ejaculation. Ejaculation is mediated by a coordinated activation of sympathetic autonomous nervous system through alpha-adrenergic stimulation and intense rhythmic smooth muscle contraction [7]. Tricyclic anti depressives, as imipramine and clomipramine, induce ejaculation due to their mechanism of increasing the bioavailability of noradrenaline in the synaptic cleft, neurotransmitter responsible for triggering the alpha adrenergic response. Alpha-adrenergic agonists, as xylazine and detomidine, act directly on alpha-1 adrenergic receptors, which are responsible for trigger ejaculation [8].

Similarly to the autonomous nervous system, hormones as estrogens, oxytocin and prostaglandins also play a key role on the ejaculation to induce smooth muscle contraction through the reproductive tract [9]. In stallions, serum oxytocin levels increase drastically before ejaculation and starts to decrease immediately after the process, suggesting its function in triggering the emission phase of ejaculation [10].

The association of imipramine, a tricyclic antidepressive, with xylazine, an alpha-adrenergic agonist, showed in previous studies a variable doses and results, ranged from 27-68% of success rates [1-3, 6, 7, 11-14]. Scarce results with detomidine, another alpha-adrenergic agonist, with results ranging from 20%-50% of success rates [4,15]. Prostaglandin 2 alpha (PGF2 α) showed the increased ejaculation rates (75%), however, with accentuated side effects as sweating and abdominal cramps [6].

Protocols with xylazine alone showed similar seminal characteristics compared to in copula ejaculates [1], while PGF2 α treatments apparently stimulate accessory sex glands, resulting in higher total volume, lower sperm

concentration and similar total number of sperm than in copula ejaculates [5]. Contrary, detomidine induced ejaculation with lower total volume, higher sperm concentration and higher total number of sperm compared to in copula ejaculates [4].

Chemical ejaculation presents a variable results regarding to time of ejaculation depending on the drugs used. Most ejaculation occur as the animal is becoming sedated, within 1-5 min after xylazine injection or as it is recovering from sedation within 15-45 min [1-3,11-13]. Intramuscularly PGF₂ α treatment resulted in ejaculations between 10-50 min [8] as well as treatments with intramuscular detomidine resulted in ejaculation between 17-47 min.

The aims of the study were: 1) Compare the efficiency of different protocols in inducing ex copula ejaculation; 2) To evaluate the success rates in inducing ex copula ejaculation when oxytocin was added to the protocols; 3) Compare seminal parameters between in copula and in ex copula ejaculates.

2. Material and Methods

This study was approved by the Animal Care and Use Committee, São Paulo State University – UNESP Botucatu, SP, Brazil.

2.1 Animals and Study Design

Sixteen sexually experienced horse stallions ranged in age from 2 to 26 years and housed in individual stalls were used as subjects. Four young stallion were 2 to 3 years old (350-420 kg), 9 adult stallions were between 4 to 18 years old (400-530 kg) and 3 aged stallions were 25 and 26 years old (400-430 kg).

Each of the sixteen stallions was given a serie of nine different protocols to induce ejaculation with two trials of each protocol at a minimum of 3-day intervals. Rate of ejaculation was described and results ex copula ejaculate characteristics were compared within subjects to baseline in copula ejaculates obtained preceding the trials.

2.2 Experimental Protocols

To pharmacological induce ex copula ejaculation were used nine protocols: X - xylazine (0.66mg/kg/i.v); XO - xylazine + oxytocin (20UI/i.v); IX -

imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66mg/kg/i.v); IXO - imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66 mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI); D - detomidine (0.02mg/kg/i.v); DO - detomidine (0.02mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI/i.v); ID - imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v); IDO - imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v) + oxytocin (20 UI/i.v); IO - imipramine (3mg/kg/v.o) + oxytocin (20 UI/i.v).

Imipramine hydrochloride were administered 2 h prior to the alpha adrenergic agonist, detomidine or xylazine, and oxytocin hormone and when ejaculation did not occur in 10 minutes, a half of dose of alpha adrenergic agonist were injected.

2.3 Trials

Induced-ejaculation trials were conducted in the stallion's box stall with a quiet environment without sexual prestimulation. Stallions were observed continuously until ejaculation occurred or for up to 2 h after administration of the alfa adrenergic agonists (xylazine or detomidine).

2.4 Semen Collection

In the week before the start of the study, stallions were collected twice with 2 days interval and then two semen samples were collected in a Botucatu® model artificial vagina (Botupharma LTDA, Botucatu, SP, Brazil) from each stallion using a phantom mount to obtain baseline measures. Induced ejaculates were collected into a plastic bag held by a plastic ring positioned over the prepuce and attached in the stallion's flank by a tiny hope.

2.5 Semen Evaluation

Immediately after semen collection, semen volume were assessed by a graduated test tube before and after the gel fraction to be removed. Sperm concentration was determined using a Neubauer chamber hemocytometer (Optik Labor®, Lancing, England) under microscopy with phase contrast at 200x magnification (Jenamed 2 Zeiss: Carl Zeiss®, Munich, Germany). Prewarmed (37° C) extender (BotuSpecial® Botupahrma LTDA, Brazil) was added to an aliquot of neat semen to obtain a sperm concentration of 50 x 10⁶ spermatozoa/

mL. This aliquot was used to examine sperm kinetic (IVOS version 12 Hamilton Thorne Research, MA, USA) of each ejaculate and compared in copula ejaculates and ex copula ejaculates. The CASA setup is described in [Table 1](#). The following parameters were evaluated: total motility (TM, %), progressive motility (PM, %), angular progressive velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), progressive velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$) and percentage of rapid sperm (RAP, %).

Table 1. Settings for stallion semen analyses

Features	Setting
Image capture (frames per sec)	60 Hz
Image capture (No. of frames)	30
Cell detection (min contrast)	30
Cell detection (min cell size)	30 pixels
Defaults (cell size)	5 pixels
Defaults (cell intensity)	40
Progressive cells (VAP)	70 $\mu\text{m/s}$
Progressive cells (STR)	80%
Slow cells (static: VAP cutoff)	30 $\mu\text{m/s}$
Slow cells (static: VSL cutoff)	20 $\mu\text{m/s}$
Illumination: intensity	3,600
Illumination: photometer	125
Video source (dark field)	60 Hz
Static intensity gates (min and max)	0.48 and 1.45
Static elongation gates (min and max)	0 and 97
Chamber-type	Makler ¹
Temperature	38° C
Field selection	Automatic

VAP average path velocity $\mu\text{m/s}$, VSL velocity straight line $\mu\text{m/s}$; STR straight %
¹Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA (chamber depth 10.0 μm , stage position 14.3 mm)

2.6 Flow Cytometry Measurement

Flow cytometric analyses were conducted using a BD LSR Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with three lasers excitation: blue 488-nm, 100 mW and emission filter 530/30nm e 695/40nm; red 640-nm, 40 mW with emission filter 660/20nm; and violet 405-nm, 100 mW, with emission filter 450/50nm. A minimum of 10.000 cells per sample were evaluated and the data analyzed using software BD FACSDiva™ software v 6.1. Samples were diluted in TALP-PVA (Parrish et al.,1988 modificado:100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-sodium lactate 60%,2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM HEPES-acid free, 1,0mM sodium piruvate, 1,0mg/mL alcohol polivinil-PVA and 25µg/mL gentamicine) to obtain a sperm concentration of 5×10^6 spz /mL.

A mixture of Hoechst 33342 (H342), propidium iodide (PI) and FITC-PSA (aglutinine of *Pisum sativum* conjugated with fluorescein isothiocyanate) was used to analyse membrane plasmatic and acrossomal integrity (MPAI) [16]. Aliquots (200µL) of sperm samples were diluted in 7µM of H342, 1,5µM of PI and 2ng of FITC-PSA, and after incubation at 37°C for 5 min, spermatozoa were analysed.

Mitochondrial activity and superoxide production (O_2^-) in mitochondrial matrix was assessed based on the method described by Freitas-Dell'Aqua et al., 2018 [17] using association of Hoechst 33342, Yopro (YP), MitoStatus Red (MST) and MitoSOX™ Red (MSR). Sperm samples of 500 µL were diluted in 7 µL of Hoechst 33342, 25nM YP, 20µM of MST and 2µM of MSR, and incubated at 37°C for 20 minutes. To measure intracelular hydrogen peroxide (H_2O_2) production aliquots (500µL) of the sperm suspension were added to 1.5µM of propidium iodide (PI) and 1µM of CM-H₂DCFDA (C6827, Life Technologies), and after incubation for 20 min at 37°C, the samples were analysed by flow cytometry.

Oxide nitric was evaluated (NO^-) by DAF-FM diacetate (D23842, Life Technologies) associated with propidium iodide. Thus, in 500µL of diluted sperm solution was added 1.5µM de propidium iodide and 10µM of DAF-FM, and samples were incubated for 30min at 37°C.

2.7 Statistical analysis

Data analysis was performed by the GraphPad Prism program version 6.0 for Windows (GraphPad software, LA Jolla, California, USA; www.graphpad.com). The results are expressed as mean and standard error, as well as their distribution by the Kolmogorov-Smirnov test and when they presented normal distribution (parametric data) were submitted to analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey test. When they did not present normal distribution (non-parametric data) were submitted to the Kruskal-Wallis test followed by Dunn to determine significant in all variables between groups, with significance of $p < 0.05$.

2.8 Sperm Morphology

Sperm morphology was performed by differential interference phase contrast (DIC) microscopy of wet-mount semen 'fixed' in isotonic formal saline using at 1000× magnification. One hundred cells were evaluated for major and minor defects [18].

2.9 Evaluation of side effects

Stallions were observed for degree of sedation, which were evaluated by observing ataxia degree, head height, ear position, ptosis of lips and responsiveness to the environment.

3. Results

3.1 Ejaculation rates

Overall, none of the 4 young stallions ejaculated in all protocols and 9 of 12 sexual mature stallions ejaculated (75%) in 6 protocol (X,XO,IX,IXO,DO and IDO), but no ejaculation occurred in protocols D, ID and IO (Table 1). Xylazine alone and with oxytocin equally induced ejaculation in 2 (16.66%) of the sexual mature stallions in 100% of the trials, while when imipramine was associated to xylazine 4 of the stallions (33.33%) responded in 75% of the trials. Likewise, detomidine associated to oxytocin induced ejaculation in 1 stallions in all trials, while imipramine associated to detomidine and oxytocin induced ejaculation in 5

stallions in 70% of the trials. None of the stallions that responded to xylazine treatments responded to detomidine treatments.

Interval from xylazine treatment to ejaculation ranged from 2 to 4 min in 3 stallions and to 15 to 20 min in 1 stallion. Interval from detomidine treatment to ejaculation ranged from 2 to 7 min. No differences on the mean time of ejaculation were observed when imipramine or oxytocin was associated to the protocols.

Table 2. Summary of pharmacological induced ex copula protocols and ejaculation rates of 12 sexually mature stallions in 2 trials of each stallion in each protocol.

Protocols		Ejaculation (%)
		Animals (n=12)
X	Xylazine (0,66 mg/kg/i.v)	16.66
XO	Xylazine (0.66 mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI)	16.66
IX	Imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66 mg/kg/i.v)	33.33
IXO	Imipramine (3mg/kg/v.o) + xylazine (0.66 mg/kg/i.v) + oxytocin (20UI)	33.33
D	Detomidine(0.02mg/kg/i.v)	0
DO	Detomidine(0.02mg/kg/i.v)+oxytocin (20 UI)	8.33
ID	Imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine (0.02mg/kg/i.v)	0
IDO	Imipramine (3mg/kg/v.o) + detomidine(0.02mg/kg/i.v)+oxytocin (20 UI)	41.6
IO	Imipramine (3mg/kg/v.o) + oxytocin (20UI)	0

3.2 Seminal Characteristics

Results are summarized in table 02. Mean total and gel free volume of induces ejaculates in protocols DO and IDO was significantly lower than in protocols using xylazine (X, XO, IX and IXO) and in copula ejaculates. Sperm concentration had higher values in DO and IDO (ANOVA, $P < 0.05$) than in protocols using xylazine (X, XO, IX and IXO) and in copula ejaculates. However, total number of sperm was similar in both ex copula and in copula ejaculates. Similarly, mean total and progressive motilities, RAP, VAP, VCL and VSL as well as sperm morphology were similar between induced and baseline ejaculates (ANOVA, $P > 0.10$).

Table 3. Mean values and standard deviation of seminal characteristics of base line in copula and pharmacologically-induced ex copula ejaculates of 9 stallions. Values were calculated from the mean of 2 ejaculates from each stallion (except 3 stallions that had only 1 induced ejaculate).

	Base line in copula	pharmacologically-induced	
		Detomidine	Xylazine
Total volume (ml)	61.3 ± 17.9 ^a	15.2 ± 12.1 ^b	45.8 ± 29.4 ^{ab}
Gel-free volume (ml)	45 ± 12,5 ^a	13.8 ± 11,5 ^b	39.3 ± 24.9 ^{ab}
Concentration (x10 ⁶)	174 ± 107.2 ^b	2.560 ± 3.222 ^a	1.114 ± 1.104 ^{ab}
Total number sperm (x10 ⁹)	7.5± 3.3	18.1± 11.2	11.8± 7.4
Total motility (%)	84± 6	82± 2.5	82± 4.2
Progressive motility (%)	37± 6.8	38± 6.7	34± 5.9
RAP (%)	77,2± 7.4	83,6± 5	74,1± 6.2
VAP (µm/s)	131.2 ± 12.6	145.4 ± 15.8	314.4 ± 510
VSL (µm/s)	97.5 ± 10.6	107.4 ± 14.4	91.5 ± 10.7
VCL (µm/s)	235,8 ± 27.1	253 ± 20.1	227,3 ± 28.4
Membrane integrity (%)	77.25 ± 5	75.53 ± 4.21	62.4 ± 27.78
Sperm abnormal morphology (%)	16 ± 4.1	20 ± 6	17 ± 4.3

Different letters in a line indicate differences ($P < 0.05$). RAP: percentage of rapid spermatozoa (%); VAP: average velocity (µm/s); VSL: linear velocity in a straight trajectory (µm/s); VCL: curvilinear velocity (µm/s).

3.3 Cytometry Evaluation

The reactive oxygen species (ROS) analyzes showed an increase ($P < 0.05$) in superoxide anion production in DO and IDO protocols when compared to the other protocols and ejaculates collected in the artificial vagina. However, the values of anion hydrogen peroxide, nitric oxide content and mitochondrial membrane potential were similar ($P > 0.05$) in all protocols than to the ejaculates collected in the artificial vagina.

3.4 Side Effects

Treatment with imipramine hydrochloride generally resulted in no sedation. However, 12 of 16 stallions showed sialorreha 1 h after imipramine administration, independently of the protocol. Discrete sialorreha was observed

in 5 stallions and moderate in 3 stallions. No sialorrhoea were observed in protocols without imipramine. The administration of xylazine resulted in sedation within 2 to 4 min, reaching mild to heavy standing sedation, with decreased respiratory rate. Animals resumed normal activity within 50 min (range, 14 to 80 min) after xylazine treatment. Sedation with detomidine occurred earlier, within 1 to 2 min from injection, reaching mild standing sedation with a discrete decrease of respiratory rate and returned to normal activity within 20 min after detomidine treatment.

4. Discussion

This new protocols represent an improvement in rate of ejaculation for pharmacologically induced ex copula ejaculation in stallions.

It is important to note that most previous study used sexually mature stallions and the present study used 4 young stallions and none of them ejaculated within the protocols, while 7 of 9 adult stallions and 2 of 3 aged stallions ejaculated. As a stallion achieve sexual maturity (maximum reproductive capacity) around 3 years after puberty and puberty period in colts extends to approximately 83 weeks age [19]. Thus, Johnson [20] observed lower FSH, LH and testosterone serum concentration in stallions above 3 years old compared to animals between 4 and 20 years old.

Similarly, Johnson [21] observed a reduced Leydig as well as sertoli cells population in stallions above 3 years old and seminal parameters had also lower quality and quantity with this age, indicating an immature spermatogenesis control. This suggests that autocrine and paracrine signalization evolved in the ejaculation are probably different from sexual mature stallions. Thus, our results assume that this 4 young stallions were not sexually mature, then the ejaculation rates were calculated based on only the 12 sexual mature stallions. We hypothesized that lower hormone concentration associated to immature paracrine and autocrine signalization could lead to no responses to pharmacological ejaculation protocols.

The addition of oxytocin increase the ejaculation rates of protocols using detomidine. Previous report using only detomidine (0.02 mg/kg/i.m) obtained 50% of success rate in a disable pony stallion [4]. Another study observed that 2

of 10 donkeys (20%) ejaculated with detomidine (0.02mg/kg/i.v) treatment [15]. Interestingly, our study had no ejaculations when detomidine alone or associated with imipramine were used. Only protocols associating detomidine to oxytocin resulted in ejaculations. In stallions, the oxytocin hormone has been used to improve the number of total spermatozoa in the ejaculate and in often times as a treatment of ampullary obstruction due to its smooth muscle contraction activity in the reproductive tract [22]. Thus, studies suggests that oxytocin play a important role in the emission phase of ejaculation [23]. The present study observed that the addition of oxytocin in the detomidine protocols helped to trigger ejaculation, probably due to smooth muscle contraction activity in the testes and epydidimus.

Contrarily, the addition of oxytocin in the xylazine treatments of this study did not increase the ejaculation rates, as all the stallions responded equally to treatments with or without oxytocin. Previous studies achieved 31% to 53% of ejaculation with imipramine intravenous 10 min before to xylazine treatment (0.33mg/kg/i.v) [2,11,13]. Johnson and DeLuca [12] used oral imipramine (2 mg/kg/v.o) 2 h previous xylazine (0.33mg/kg/i.v) and achieved 57% of ejaculation rate. Similarly to our findings, Feary et al [6] achieved 33% of success rate with imipramine hydrochloride (3 mg/kg/v.o) associated to xylazine hydrochloride (0.5 mg/kg/i.v) in a disable aged stallion. The best results associating imipramine and xylazine obtained 68% of success rates using imipramine (3 mg/kg/v.o) 2 hours prior xylazine treatment (0.66mg/kg/i.v) [8]. However, this study obtained different results, with 4 of 16 stallions (33.33%) ejaculating using the same protocol as McDonnell (2001) [5]. Unsatisfactory results were also obtained by Correa and Bozzo [14] using Imipramine Pamoate (3mg/kg/v.o-Tofranil® 75 mg) followed 2 hours later by xylazine hydrochloride (0.66mg/kg/i.v), achieving only 16,66% of ejaculation rate in 6 attempts in 2 adult stallions.

The mean ejaculation occurred within 8 min of xylazine injection, ranged from 2-20 min. Previous reports showed similar results, with ejaculation ranged from 0.5 to 20 min [1,3,5,6,14]. Another study observed that 4 stallions ejaculated between 5-11 minutes and another 3 stallions ejaculated between 35-45 minutes, within a tendency of the same stallion repeat the mean time in all ejaculation trials [2]. This reports evidence that most ejaculations occur either

as the stallion is becoming sedated or as it was recovering from sedation, as xylazine achieve plasma peak concentration around 5 min and has a half life of 31 min [24,25]. Similar results were obtained here, since the stallion which ejaculated within 20 min of xylazine injection apparently was recovering from sedation at that time. This study also observed that each stallion had a individual time of ejaculation after injection, and the time of ejaculation was repeated between trials.

Similarly from xylazine protocols, the mean ejaculation occurred within 5 min of detomidine injection, ranged from 2-15 min. This result suggests that detomidine induces most ejaculation during the concentrations peak, since maximum plasma concentration after detomidine (0.03mg/kg/i.v) administration is around 1.5 min and half-life of 10 min [26]. However, in a previous report the time required for ejaculations after detomidine, intramuscular injection, ranged from 17 to 47 min, with an average of 27.5 min/ejaculation in a pony stallion [4]. This pony stallion probably ejaculated later than the stallions from our study because detomidine peak concentration after intramuscular administration occur later than in intravenous administration [26].

After detomidine treatment (IDO) in only 1 trial, 1 stallion ejaculated within 15 min of injection during masturbation. In contrast, McDonnell and Odian [11] observed all trials that resulted in ejaculation were during masturbation. The present study observed masturbation in 2 of the 16 stallions (13.33%) and in 4 of the 36 trials (11.1%). Previous reports obtained higher results, with masturbation occurring in 52% of the trials and erection occurring in 71% [11]. In the present study, erection occurred in 5 of the 16 stallions (33%) and in 40 of 54 trials (74%) of the 5 stallions.

Erection seem to be related to imipramine administration, since studies using only alfa adrenergic agonist to induce ex copula ejaculation did not result in erections, only penile protusion [1,4]. The present study also observed erection only in protocols with imipramine associated. In another study, imipramine intravenous administration in 5 stallions resulted in erection followed by masturbation and two ejaculation [27]. Similarly, a study using clomipramina (2.2mg/kg/i.v), another trycyclic antidepressive, observed erection and masturbation 7 min after its administration in a disable old stallion [28]. This

study observed erection in 2 young stallions and 3 adult stallions, no erection and masturbation were observed in aged stallions. Despite the mechanism of action is not completely understood, it is believed that imipramine and clomipramine promote erection and masturbation by dopaminergic stimulation [29,30]. Also, the alpha adrenergic activity promoted by norepinephrine re-uptake could lead to ejaculation [22]. These lower rates of erection and masturbation suggests that imipramine administrated orally instead of intravenous has less effect on this two physiological reactions.

Semen characteristics from the protocols tested in this study were mostly similar to previous reports of pharmacologic-induced ejaculation. Protocols using detomidine resulted in higher sperm concentration, higher total number of sperm and lower total volume in a previous studies [4,15]. Similarly, this study observed a higher concentration and decreased total and free gel volume ($P < 0.05$) when detomidine was used, however, the total number of spermatozoas did not differ from the baseline and the others protocols evaluated (X, XO, IX, and IXO).

Protocols based on the association of imipramine and xylazine had lower total and gel volume free, higher sperm concentration and higher total number of sperm in the pharmacologically-induced ejaculates compared to in copula ejaculates in previous studies [2,3,11-13,31]. This suggest that lower total volume is due to imipramine's capacity of decrease accessory sex glands contraction, since a study using xylazine alone did not obtain differences in ex copula and in copula seminal characteristics [1]. This is in contrast to our results, in which did not observe differences in volume, concentration and total number of sperm when imipramine was added to the protocols using only xylazine or xylazine associated with oxytocin. The imipramine also had no effect on the seminal parameters when associated with detomidine and oxytocin.

No differences were noted in sperm kinetics (TM, PM, RAP, VAP, VCL and VSL) and sperm morphology between ex copula and baseline ejaculates. These results agree with earlier studies [3,13,14,31], evidencing that ex copula ejaculates presents normal sperm viability and can be normally used in the assisted reproductive programs.

The reactive oxygen species (ROS) are characterized as one or more unpaired electrons and non-radical oxygen derivatives, with like hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ion (O_2^-) and nitric oxide (NO). These ROS are formed during energy production by spermatozoa, however, an imbalance between the production and degradation of ROS leads to oxidative stress, causing damage to the plasmatic membrane of spermatozoa [32]. ROS analysis in this study showed a significant increase in superoxide ion ($P < 0.05$) in the semen obtained in detomidine protocols but similar peroxide and nitric oxide in all protocols compared to baseline ejaculates. We hypothesize that this increase in superoxide anion is directly related to a decreased seminal volume in these two protocols. The lower total volume results in reduced seminal plasma, consequently the ejaculates from protocols DO and IDO had lower antioxidants that prevent spermatozoa oxidative stress. Antioxidants are important in preventing oxidative stress and ROS production. Thus, seminal plasma has a protective effect due to the high concentration and variety of antioxidants present in its composition [33].

The use of a small group of animals in these analyzes could also have been an important factor to obtain this result, since this increase was probably influenced by individual characteristics. It was observed that only one of the stallions had extremely high superoxide anion levels in the ejaculates and, as the number of animals was small, the present study obtained these results.

Although the values in the O_2^- anion were altered in different protocols, it did not influence mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), which presented similar results in all the ejaculates evaluated.

Previous study using $PGF_{2\alpha}$ to induce ex copula ejaculation observed urine contamination as a side effect, associated to intense abdominal cramps and sweating [8]. In this study similar side effects were not observed even in protocols with oxytocin. Also, oxytocin did not enhance accessory sex glands contraction, as observed in a study using $PGF_{2\alpha}$ [5].

The major side effect observed in our study were the sialorrhoea followed by imipramine administration. The stallions seemed dissatisfied after the imipramine administration and the addition of corn glucose on the imipramine tablets attenuate the rejection to the imipramine despite not reduce the

sialorreha. Other studies administered imipramine orally crushed the tablets and gave with feed [12], molasses [6] or sweet flavor [5] and did not report sialorreha. Thus, similar side effects were described when imipramine intravenous was used [13], evidencing that this effects it is probably due to an cholinergic mechanism of action that justify this effect, since imipramine is a tricyclic antidepressive with several unspecific mechanism of action.

In conclusion, the protocols tested did not induce ejaculation in stallions above 4 years old. Also, this study observed that anxious and scared stallions required higher doses to induce ejaculation. Thus, administration of the protocols in the animal's stall with a quiet environment was fundamental for the success of the treatment. In the mean time, the use of different protocols with detomidine and xylazine in the same stallion increased the success rates since stallions that ejaculated with detomidine did not ejaculate with xylazine. Also, oxytocin showed to increase the ejaculatory function associated to detomidine with no adverse side effects.

Acknowledgments: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant #2016/21452-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

- [1] McDonnell SM, Love CC. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 1991;36:73-6.
- [2] McDonnell SM, Turner RMO. Post-thaw motility and longevity of motility of imipramine-induced ejaculates of pony stallions. *Theriogenology* 1994;42:475-81.
- [3] Card CE, Manning ST. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled horse. *Can Vet J* 1997;38:171-4.
- [4] Rowley DD, Lock TF, Shipley CF. Fertility of detomidine HCl induced ex copula ejaculated stallion semen. *Proc AAEP* 1999;45:221-3.
- [5] McDonnell SM. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Anim Reprod Sci* 2001;68:153-9.
- [6] Feary DJ, Moffet PD, Bruemmer JE, Southwood L, McCue P, Niswender KD, Dickinson C, Traub-dargatz J. Chemical ejaculation and cryopreservation of semen from a breeding stallion with paraphimosis secondary to priapism and haemorrhagic colitis. *Case Report. Equine Vet Educ* 2005;17:299-304.
- [7] Clemente P, Giuliano F. Physiology and pharmacology of ejaculation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2016;64:121-9.
- [8] McDonnell SM. Ejaculation: physiology and dysfunction. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1992;8:57-70.
- [9] Vignozzi I, Filippi S, Morelli A, Luconi M, Jannini E, Forti G, Maggi M. Continuing medical education: regulation of epididymal contractility during semen emission, the first part of the ejaculatory process: a role for estrogen (CME). *J Sex Med* 2008;5:2010-6.
- [10] Veronesi MC, Tosi U, Villani M, Govoni N, Faustini M, Kindahl H, Madej A, Carluccio A. Oxytocin, vasopressin, prostaglandin F_{2a} , luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate, and cortisol plasma concentrations after sexual stimulation in stallions. *Theriogenology* 2010;73:460-7.

- [11] McDonnell SM, Odian MJ. Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 1994;41:1005-10.
- [12] Johnston PF, DeLuca JL. Chemical ejaculation of stallions after administration of oral imipramine followed by intravenous xylazine. *Proc AAEP*. 1998;43:59-62.
- [13] Dutra FO. Indução da ejaculação em equinos através da utilização da imipramina e de sua associação com xilazina [dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2000.
- [14] Correa SC, Bozzo MIO. Pharmacological ex copula ejaculation in Holsteiner stallions. 2016.
- [15] Miroslava-Mrackova DVM, Blahova Z, Marketa Sedlinska DVM. The Realibility of two different protocols for pharmacologically induced ejaculation in donkeys (*Equus asinus*). *J Equine Vet Sci* 2013;33:1121-3.
- [16] Freitas-Dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim Reprod* 2012;9:941.
- [17] Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Papa FO, Canisso IF, Dell'Aqua Jr JA. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. *J Equine Vet Scie* 2018;66.
- [18] Blom E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med* 1973;25:383-91.
- [19] McDonnell SM. Ejaculation: physiology and dysfunction. *Vet Clin North Am Equine Pract*. 1992;8:57-70.
- [20] Johnson L, Thompson Jr DL. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol Reprod* 1983;29:777-89.
- [21] Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol Reprod* 1981;24:703-12.

- [22] McDonnell SM. Pharmacological manipulation of ejaculation. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Equine reproduction. 2nd ed. Iowa: Wiley Blackwell; 2011. p. 1413-4.
- [23] Corona G, Jannini EA, Vignozzi L, Rastrelli G, Maggi M. The hormonal control of ejaculation. *Nat Rev Urol*. 2012;9:508-19.
- [24] Santonastaso A, Hardy J, Cohen N, Fajt V. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of xylazine administered by the intravenous or intraosseous route in adult horses. *J Vet Pharmacol Ther* 2014;37:565-70.
- [25] Knych HK, Stanley SD, McKemie DS, Arthur RM, Kass PH. Pharmacokinetic and pharmacodynamics of xylazine administered to exercised thoroughbred horses. *Drug Test Anal* 2017;9:713-20.
- [26] Mama KR, Grimsrud K, Snell T, Stanley S. Plasma concentrations, behavioural and physiological effects following intravenous and intramuscular detomidine in horses. *Equine Vet J* 2009;41:772-7.
- [27] McDonnell SM, Garcia MC, Kenney RM. Imipramine-induced erection, masturbation, and ejaculation in male horses. *Pharmacol Biochem Behav* 1987;27:187-91.
- [28] Turner RO, Love CC, McDonnell SM, Sweeney RW, Twitchell ED, Habecker PL, Kenney RM. Use of imipramine hydrochloride for treatment of urospermia in a stallion with a dysfunctional bladder. *J Am Vet Med Assoc* 1995;20:1602-6.
- [29] Segraves RT. Effects of psychotropic drugs on human erection and ejaculation. *Arch Gen Psychiatr* 1989;46:275-84.
- [30] Serretti A, Chiesa A. Sexual side effects of pharmacological treatment of psychiatric diseases. *Clin Pharmacol Ther* 2011;89:142-7.
- [31] Naoman UT, Ali AJ. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically induced ejaculation in donkeys. *Iraqi J Vet Sci* 2012;26:81-3.
- [32] Kawai GKV, Gurgel JRC, Agostini Losano JD, Dalmazzo A, Rocha CC, Tsunoda RH, Barnabe VH. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. *J Equine Vet Sci* 2017;55:76-83.

[33] Sampaio BFB. Adição de vitamina C, AA2G, α -tocoferol e ácido docosahexaenoico ao diluidor de refrigeração do sêmen equino [tese]. Campo Grande: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2015.