**Uso de BWW modificado para refrigeração de sêmen equino – CIÊNCIAS DA TERRA**

**William Morais Machado1, Thalita Marques Brito1, Larissa Rodrigues de Santana1, Maíra Guimarães Kersul1, Diego Passos Guimarães1, Paola Pereira das Neves Snoeck1**\*

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

\*E-mail**:** machadowm.vet@gmail.com

Os diluidores seminais utilizados nos processos de conservação do sêmen em baixas temperaturas têm como principal objetivo proteger e minimizar os danos espermáticos, principalmente os decorrentes do choque frio. Uma das formas de evitar o choque térmico é pela adição de fontes de macromoléculas nas formulações diluidoras, as mais usuais são a gema de ovo, o leite e seus derivados. Uma desvantagem desses componentes de origem animal é o risco sanitário, além de resultar em diluidores sem padronização química. A busca pela padronização dos diluidores seminais acabou induzindo muitas pesquisas em formulações quimicamente definidas, como o meio descrito por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW), capaz de preservar o sêmen equino por vários dias em temperatura ambiente. Este diluidor não foi desenvolvido para preservar os espermatozoides nas temperaturas usuais de refrigeração, no entanto, sua formulação oferece componentes importantes para manutenção do metabolismo espermático. Objetivou-se utilizar o meio quimicamente definido BWW para refrigerar a 15 oC o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador e investigar a influência da adição do ácido docosa-hexaenoico (DHA), da rosiglitazona (ROSI) e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e suas associações sobre os parâmetros espermáticos. Um total de nove ejaculados obtidos de três garanhões foram coletados por meio de vagina artificial, o sêmen foi diluído para obtenção de 25 x 106 espermatozoides / mL nos diferentes diluidores, formando os seguintes grupos experimentais: D1) BotuSêmen®; D2) BWW; D3) BWW + 30ng/mL-1 de DHA + 50 μM de ROSI; D4) BWW + 50 μM de ROSI; D5) BWW + 30ng/mL-1 de DHA; D6) BWW + 10% de LDL+ 30ng/mL-1 de DHA + 50 μM de ROSI; D7) BWW + 10% de LDL+ 30ng/mL-1 de DHA; D8) BWW + 10% de LDL + 50 μM de ROSI; D9) BWW + 10% de LDL. As amostras diluídas foram submetidas à refrigeração em caixa BotuFlex® até atingir a temperatura de 15 oC, quando foram transferidas e mantidas na mesma temperatura por até 24 horas em refrigeradora MiniTube®. Para avaliar o efeito dos diluidores sobre os espermatozoides foram estudados os parâmetros de cinemática espermática pelo SCA Evolution ®; a integridade funcional da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST) utilizando solução de sacarose a 100 mOsmol/L; a integridade estrutural das membranas por meio das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP); a integridade da cromatina espermática utilizando a técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina e a atividade mitocondrial por meio da coloração de 3,3’- diaminobenzidina (DAB). Os dados foram submetidos Análise de Variância e teste de Tukey para testar as diferenças entre os diluidores. Todas as análises foram feitas utilizando o software SPSS, com nível de significância de 5%. Os meios BWW modificados foram capazes de manter a motilidade total igualmente ao controle (P > 0,05) exceto o com adição somente de LDL (D9; P < 0,05). Os diluidores BWW com DHA + ROSI e BWW + ROSI preservaram o percentual de progressivamente móveis semelhante ao BotuSêmen® (P > 0,05). Os diluidores BWW contendo LDL, LDL + ROSI e associação de LDL+ DHA + ROSI foram inferiores ao BotuSêmen® para preservar parâmetros cinemáticos importantes como a VCL, VAP e BCF (D6, D8 e D9; P <0,05). Além disso, a ALH dos espermatozoides refrigerados em BWW + LDL e BWW + LDL + ROSI também estava menor quando comparado com as células diluídas no meio controle (P < 0,05). Os parâmetros de linearidade e retilinearidade não diferiram entre as amostras refrigeradas nos diluidores testados (P > 0,05). Todos os diluidores testados preservaram de forma semelhante parâmetros de viabilidade espermática importantes como: a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, a atividade mitocondrial e a integridade do DNA depois de avaliada a compactação da cromatina. Concluímos que os diluidores quimicamente definidos testados no presente estudo podem ser uma alternativa segura em substituição ao BotuSêmen® para refrigerar o sêmen de garanhões a 15° C por 24 horas, no entanto, ressaltamos que a adição de LDL na concentração estudada não foi interessante para preservar parâmetros cinemáticos importantes para a fertilidade.

**Palavras-chave**: Refrigeração, BWW, DHA, rosiglitazona, LDL.