

CAROLINA SILVEIRA FONTES

**TESTE DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA À MEMBRANA PERIVITELÍNICA DA
GEMA DO OVO DE GALINHA PARA AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SÊMEN DE
EQUÍDEOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F683t
2023
Fontes, Carolina Silveira, 1996-
 Teste de ligação espermática à membrana perivitelínica da
 gema do ovo de galinha para avaliação funcional do sêmen de
 equídeos / Carolina Silveira Fontes. – Viçosa, MG, 2023.
 1 dissertação eletrônica (77 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndice.

Orientador: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.710>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cavalos - Reprodução. 2. Jumentos - Reprodução.
3. Espermatozoides - Avaliação. 4. Fecundidade. I. Silva, Yamê
Fabres Robaina Sancler da, 1987-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.10824


CAROLINA SILVEIRA FONTES

**TESTE DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA À MEMBRANA PERIVITELÍNICA DA GEMA
DO OVO DE GALINHA PARA AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SÊMEN DE
EQUÍDEOS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de julho de 2023

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **CAROLINA SILVEIRA FONTES**
Data: 14/11/2023 12:04:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Carolina Silveira Fontes
Autora

Documento assinado digitalmente
 **YAMÉ FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA**
Data: 14/11/2023 14:29:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva
Orientadora

Dedico este trabalho à minha querida avó
Ilda, suas incontáveis orações foram um lindo
gesto de amor e carinho.

Saudade do seu cheirinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo incentivo, amparo e compreensão. Vocês são excelentes profissionais e inspiração para mim, seus esforços diários não passam despercebidos e sou muita grata à toda educação que vocês me proporcionaram. Amo muito vocês!

À minha irmã, por entender minhas angústias e me confortar. Você tem o coraçãozinho maior do mundo, na verdade agora tem dois, te amo irmã!

Ao meu noivo, por ser ao mesmo tempo meu amigo e meu amor, minha fonte de calma e de coragem, minha paz e emoção. Te amo Chu, nossa história é longa e está só começando.

Às minhas filhas gatas, Luna e Mica, minhas grandes companheirinhas, por protegerem os meus sonhos e acalmarem os meus dias mais difíceis. Vocês são sinônimo de amor e carinho pra mim.

Aos meus avós, os presentes e os que já se foram, por todo carinho, cuidado e orações, vocês estão comigo onde quer que eu vá.

Aos meus tios, tias, primos, primas e demais familiares, por cada encontro em que vivemos momentos felizes e inesquecíveis renovando minhas energias e me dando força para seguir em frente.

À minha orientadora Yamê, pela orientação, dedicação e incentivo do início ao fim do meu projeto. Muita obrigada pela oportunidade e pelo exemplo de mulher fazendo ciência.

Ao Cristian, pelo apoio e por todo auxílio no manejo dos animais durante o período experimental

À UEPE em Equideocultura da UFV, em nome da professora Yamê e do técnico Cristian, pela disponibilização dos animais e infraestrutura.

Aos estagiários da UEPE e estudantes de pós-graduação do DZO, em especial à Marcela, que foi meu braço direito durante a fase experimental, por toda força, ajuda e amizade.

Aos funcionários da UEPE em Equideocultura da UFV, por todo auxílio no manejo dos animais, o trabalho de vocês é árduo e importantíssimo.

Aos equídeos, com os quais tive o prazer de aprender e que colaboraram inocentemente para execução deste trabalho. Diante da grandeza deles reconheci quão arrogantes e ao mesmo tempo frágeis são os seres humanos.

Ao querido Henry, pelo grande auxílio nas análises estatísticas, pela disposição, ensinamentos e palavras de incentivo.

Ao Professor Tarcízio, pela disposição em compartilhar seus conhecimentos e ao professor Leandro, pela ajuda e discussões relativas as análises de citometria de fluxo.

Ao Departamento de Zootecnia, seus professores e funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Universidade Federal de Viçosa e a cidade de Viçosa, que, sem dúvida, me fizeram mais forte e resiliente e foram ponto de encontro para personagens essenciais na minha história. Muito obrigada!

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

FONTES, Carolina Silveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Teste de ligação espermática à membrana perivitelínica da gema do ovo de alinha para avaliação funcional do sêmen de equídeos.** Orientadora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de ligação de espermatozoides equinos e asininos à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG) e avaliar a influência da adição do plasma seminal na capacidade de ligação de espermatozoides frescos e descongelados. No experimento I, comparou-se a capacidade de ligação à MPOG de amostras com viabilidades espermáticas (VEs) de 0, 25, 50 e 75 e 100%, em duas doses inseminantes distintas: 10 milhões (DI10) e 50 milhões (DI50) de espermatozoides totais. No experimento II, avaliou-se a capacidade de ligação à MPOG de amostras divididas em quatro tratamentos: sêmen fresco sem plasma seminal (SFSPS), sêmen fresco com plasma seminal (SFCPS), sêmen congelado sem plasma seminal (SCSPS) e sêmen congelado com plasma seminal (SCCPS). Todas as comparações entre médias foram avaliadas utilizando o pacote PROC GLIMMIX, sendo considerada diferença estatística quando $p < 0,05$ e tendência quando $0,05 < p < 0,1$. No experimento I, quando o efeito da espécie foi desconsiderado, a DI10 apresentou menor NEL/ MPOG para VE0 em relação as outras VEs ($p \leq 0.0041$). Já a DI50 obteve menor NEL/C MPOG para VE0 em relação a VE75 e VE100 ($p \leq 0.017$) e maior NEL/C MPOG para VE100 em relação a VE25 e VE50 ($p \leq 0.0321$). Para os asininos, a DI10 teve maior NEL/C MPOG para VE75 em relação à VE0 ($p = 0.028$) e tendência em relação à VE50 ($p = 0.0749$). Já com a DI50 a NEL/C MPOG foi maior para VE100 em relação a VE0 e VE25 ($p \leq 0.0472$). Para os equinos, não houve diferença estatística na NEL/C MPOG entre as VEs quando utilizada a DI10, entretanto com a DI50 o NEL/C MPOG foi maior para VE100 em relação a VE0 ($p = 0.0209$). Observou-se moderada correlação positiva entre a NEL/C MPOG e o parâmetro de integridade de membrana plasmática ($p = 0.0306$; $r = 0.6970$). No experimento II, foi observado maior NEL/C MPOG no sêmen descongelado quando comparado ao sêmen fresco tanto na espécie equina ($p = 0.0185$) quanto na asinina ($p = 0.0390$). Adicionalmente, a NEL/C MPOG no grupo SDCPS foi maior para os equinos em relação aos asininos ($p = 0.0181$). Não foi observado efeito do plasma seminal na NEL/C MPOG para as duas espécies. Os resultados do estudo indicam

que a capacidade de ligação dos espermatozoides à MPOG é diferente entre garanhão e jumento e influenciada pela DI utilizada. O teste é capaz de diferenciar partidas seminais inférteis (0% de VE) de partidas seminais com potencial de fertilidade a partir de 25% e 75% de VE, quando utilizadas as doses de 10×10^6 e 50×10^6 sptzs totais, respectivamente. Para as duas espécies o processo de criopreservação não diminui a capacidade de ligação espermática à MPOG, sendo observada maior NEL/C MPOG para a partida seminal após o congelamento em relação à partida fresca. Por fim, a adição de 10% plasma seminal (v/v) não interfere na ligação espermática à MPOG.

Palavras-chave: Avaliação espermática. Membrana perivitelínica. Equinos. Asininos.

ABSTRACT

FONTES, Carolina Silveira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023. **Sperm-binding to the perivitelline membrane of chicken egg yolk assay as a functional test of stallion and donkey semen.** Adviser: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.

The objective of this work was to evaluate the binding capacity of equine and donkey spermatozoa to the perivitelline membrane of chicken egg yolk (MPOG) and the influence of the addition of seminal plasma on the binding capacity of fresh and frozen spermatozoa. In experiment I, the binding capacity to the MPOG of samples with sperm viabilities (VEs) of 0, 25, 50 and 75 and 100% was compared, at two different inseminating doses: 10 million (DI10) and 50 million (DI50) of total spermatozoa. In experiment II, the samples were divided into four treatments: fresh semen without seminal plasma (SFSPS), fresh semen with seminal plasma (SFCPS), frozen semen without seminal plasma (SCSPS) and frozen semen with seminal plasma (SCCPS) to evaluate for the binding capacity of the spermatozoa to the MPOG. All comparisons between means were evaluated using the PROC GLIMMIX package, considering a statistical difference when $p < 0.05$ and tendency when $0.05 < p < 0.1$. In experiment I, when the effect of species was disregarded, DI10 presented a lower NEL/MPOG (average number of bound spermatozoa per MPOG field) for VE0 compared to the other VEs ($p \leq 0.0041$). DI50 had a lower NEL/C MPOG for VE0 in relation to VE75 and VE100 ($p \leq 0.017$) and a higher NEL/C MPOG for VE100 in relation to VE25 and VE50 ($p \leq 0.0321$). For donkeys, DI10 had a higher NEL/C MPOG for VE75 in relation to VE0 ($p = 0.028$) and tendency in relation to VE50 ($p = 0.0749$). Towards DI50, NEL/C MPOG was higher for VE100 in relation to VE0 and VE25 ($p \leq 0.0472$). For horses, there was no statistical difference in NEL/C MPOG between VEs when using DI10, however with DI50 the NEL/C MPOG was higher for VE100 in relation to VE0 ($p = 0.0209$). A moderate positive correlation was observed between NEL/C MPOG and the plasma membrane integrity parameter ($p = 0.0306$; $r = 0.6970$). In experiment II, a higher NEL/C MPOG was observed in frozen semen when compared to fresh semen in both equine ($p = 0.0185$) and donkey ($p = 0.0390$) species. Additionally, NEL/C MPOG in the SCCPS group was higher for horses compared to donkeys ($p = 0.0181$). No effect of seminal plasma on NEL/C MPOG was observed for both species. The results of the study indicate that the binding capacity of sperm to MPOG is different between stallions and

donkeys and is influenced by the DI used. The test is capable of differentiating infertile seminal batches (0% VE) from seminal batches with fertility potential from 25% and 75% VE, when used doses of 10 million and 50 million of total spermatozoa, respectively. For both species, the cryopreservation process does not reduce sperm binding capacity to MPOG, with a higher NEL/C MPOG being observed for the seminal batch after freezing in relation to the fresh batch. Finally, the addition of 10% seminal plasma (v/v) does not interfere with sperm binding capacity to the MPOG.

Keywords: Sperm evaluation. Perivitelline membrane. Horses. Donkeys.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Confeção dos aparatos contendo a membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG). (A) Secção de fragmento com aproximadamente cm^2 ; (B) Posicionamento do fragmento sobre a perfuração do aparato; (C) Fixação do fragmento aos aparatos com fita Parafilm[®] M.50
- Figura 2.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides equídeos ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) com doses inseminantes de 10×10^6 sptzs totais (A) e 50×10^6 sptzs totais (B) avaliadas. 55
- Figura 3.** Imagens representativas de microscopia de epifluorescência (aumento 400x) das lâminas de MPOG após incubação dos espermatozoides e coloração com iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), para as espécies equina e asinina, com viabilidade espermática (VE) de 0 e 100% em dose inseminante de 10×10^6 espermatozoides totais (DI10) e de 50×10^6 espermatozoides totais (DI50).
.....58
- Figura 4.** Correlações (A-C) entre o número de espermatozoides viáveis (proporção vivos/mortos) e a motilidade total (MT), vigor (VIG) e integridade de membrana plasmática (IMP). Correlação entre análise de integridade de membrana plasmática (IMP) e média do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) (D).59
- Figura 5.** Imagens representativas de microscopia de epifluorescência (aumento 400x) das lâminas de membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG) após incubação dos espermatozoides e coloração com as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) para as espécies equina e asinina com dose inseminante de 10 milhões de espermatozoides totais (DI10) para os tratamentos sêmen fresco com adição de plasma seminal (SFCPS), sêmen fresco sem adição de plasma seminal (SFSPS), sêmen congelado com adição de plasma seminal (SCCPS) e sêmen congelado sem adição de plasma seminal (SDSPS).....62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Proporção de espermatozoides vivos obtida em cada amostra seminal após diluições seriadas em cinco porcentagens de viabilidade espermática (0, 25, 50, 75 e 100%) determinadas por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI).....51
- Tabela 2.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides equídeos ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) para duas doses inseminantes (DI 10×10^6 sptzs totais versus DI 50×10^6 sptzs totais).56
- Tabela 3.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) para machos da espécie equina e asinina com dose inseminante (DI) de 10×10^6 sptzs totais.....57
- Tabela 4.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) para machos da espécie equina e asinina com dose inseminante (DI) de 50×10^6 de espermatozoides totais.57
- Tabela 5.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) determinados pelo tipo de sêmen (fresco ou congelado).60
- Tabela 6.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) determinados pelo tipo de sêmen (fresco ou congelado) e pela adição (CPS) ou não (SPS) de plasma seminal.....61
- Tabela 7.** Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) determinados pelo tipo de sêmen (fresco ou congelado) e pela adição (CPS) e ou não (SPS) de plasma seminal.61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ L	Microlitro
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CEUAP	Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPS	Com plasma seminal
DI	Dose inseminante
DI10	Dose inseminante de 10×10^6 espermatozoides totais
DI50	Dose inseminante de 50×10^6 espermatozoides totais
DZO	Departamento de Zootecnia
EROs	Espécies reativas de oxigênio
h	Hora
IMP	Integridade de membrana plasmática
kDa	Quilodalton
kg	Quilogramas
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MP	Motilidade progressiva
MPOG	Membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha
MT	Motilidade total
N ₂	Nitrogênio líquido
NEL/C MPOG	Número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha
PI	Iodeto de propídio
PMN	Polimorfonucleares
PS	Plasma seminal
SDCPS	Sêmen descongelado com plasma seminal
SDSPS	Sêmen descongelado sem plasma seminal
seg	Segundos
SFCPS	Sêmen fresco com plasma seminal
SFSPS	Sêmen fresco sem plasma seminal

SPS	Sem plasma seminal
sptz	Espermatozoide
sptzs móveis/mL	Espermatozoides móveis por mililitro
UFV	Universidade Federal de Viçosa
VE	Viabilidade espermática
VE0	Amostra com 0% de viabilidade espermática
VE25	Amostra com 25% de viabilidade espermática
VE50	Amostra com 50% de viabilidade espermática
VE75	Amostra com 75% de viabilidade espermática
VE100	Amostra com 100% de viabilidade espermática
VIG	Vigor espermático
ZP	Zona pelúcida

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	17
Fertilização.....	17
Fertilidade	19
Membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG).....	21
Equinos <i>versus</i> asininos	24
Criopreservação seminal	25
Plasma seminal.....	27
OBJETIVO GERAL	32
HIPÓTESES	33
REFERÊNCIAS	34
ARTIGO CIENTÍFICO	42
RESUMO	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
Aspectos éticos do estudo.....	46
Animais e local do estudo.....	47
Colheitas e avaliações seminais.....	47
Confecção dos aparatos contendo a MPOG.....	49
RESULTADOS.....	55
DISCUSSÃO	63
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
APÊNDICE	77

INTRODUÇÃO

O Complexo do Agronegócio do Cavalo movimenta cerca de R\$ 16 bilhões ao ano no Brasil (MAPA, 2016). Somado a isto, existe um crescente interesse pelos asininos e seus híbridos, principalmente devido a sua valorização cultural, social e demanda em atividades agropecuárias. Dessa forma, o melhor entendimento de aspectos relacionados a reprodução de machos equídeos pode ser visto como fator determinante para acelerar o ganho genético e a competitividade dessas espécies, visto que a redução da fertilidade resulta em importantes perdas econômicas.

Diferente de outros animais de produção em que a fertilidade é um dos principais fatores para a seleção de animais reprodutores, para equídeos a seleção visa principalmente desempenho atlético e parâmetros de conformação particulares a cada raça (VARNER, 2016). Ao longo do tempo, a ausência de seleção de características reprodutivas contribuiu para a elevada incidência de machos subférteis e este é hoje um dos principais entraves relacionados a reprodução de equídeos.

A avaliação da fertilidade *in vivo* de um macho consiste no cruzamento deste animal com um número adequado de fêmeas férteis seguido da avaliação da taxa de prenhez e/ou de potros nascidos vivos (PIMENTEL, 1989). Entretanto, na rotina essa prática é demorada, onerosa e laboriosa. Adicionalmente, os resultados não correspondem apenas a fertilidade do macho e são influenciados também por fatores relacionados às fêmeas, frequência de acasalamentos, e, no caso de inseminação artificial, pela manipulação do sêmen, pelo inseminador e momento da inseminação.

O sucesso na etapa de fertilização em todas as espécies depende de uma sequência linear de eventos. Dessa forma, o exame andrológico busca identificar alterações macro e microscópicas que apresentam correlação com esses eventos e, portanto, influenciam a fertilidade de um reprodutor. Ainda assim, testes adicionais foram propostos a fim de apontar possíveis causas de infertilidade ou subfertilidade específicas que o exame andrológico não é capaz de identificar. Esses testes buscam avaliar a capacidade de interação entre os gametas masculino e feminino, como o ensaio de hemizona (FAZELI, STEENWEG, *et al.*, 1995), o teste de ligação heterólogo ao oviduto (CARNEIRO, MONTEIRO, *et al.*, 2017), bem como o teste de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG). Este último, apresenta bons resultados em outras espécies e é possível devido à homologia entre a MPOG de aves e a zona pelúcida (ZP) de mamíferos. Como vantagens em relação aos

citados anteriormente, destaca-se o menor custo, facilidade de acesso e alto rendimento (com um único ovo podem ser realizados múltiplos testes).

O plasma seminal, um dos componentes do ejaculado, fisiologicamente apresenta constituintes que atuam tanto sobre os espermatozoides quanto no trato genital feminino. Por outro lado, a maioria dos protocolos para congelamento do sêmen de equídeos preconiza a remoção do plasma seminal ainda nas primeiras etapas do processo de criopreservação. Ainda não existe, entretanto, consenso na literatura quanto ao resultado da sua presença, ausência total ou parcial em relação ao potencial fertilizante dos espermatozoides.

Nesse sentido, os objetivos do presente estudo incluíram: validar o uso do teste de ligação espermática à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG) tanto para equinos quanto asininos; correlacionar os resultados do teste de ligação à MPOG com diversos parâmetros de qualidade espermática; avaliar e comparar o efeito da adição de plasma seminal na capacidade de ligação de espermatozoides frescos e criopreservados de equídeos à MPOG.

REVISÃO DE LITERATURA

Fertilização

Após a saída dos testículos os espermatozoides ainda não possuem a habilidade de se movimentar e são incapazes de fertilizar o oócito (AMANN, 2011), sendo necessárias duas etapas para que eles se tornem competentes: a maturação e a capacitação. A maturação, que ocorre ainda no sistema reprodutor do macho, é definida como todas as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem no espermatozoide durante o trânsito epididimário permitindo que ele seja posteriormente capacitado (TOSHIMORI, 2003; GERVASI e VISCONTI, 2016).

O microambiente luminal do epidídimo é isolado pela barreira hemato-epididimária (BHE) para proteção dos gametas masculinos, e em gananhões o fluido epididimário é composto por mais de 250 proteínas distribuídas de forma distinta entre as regiões da cabeça, corpo e cauda, sendo as mais abundantes a albumina, lactoferrina e clusterina (FOUCHÉCOURT, MÉTAYER, *et al.*, 2000). As mudanças morfofuncionais que ocorrem nos espermatozoides durante a maturação podem ser resumidas em: aquisição de motilidade progressiva, migração da gota citoplasmática, mudanças na cromatina do núcleo do espermatozoide e alteração no tamanho do acrossoma (HAFEZ e HAFEZ, 2004; AMANN, 2011; GERVASI e VISCONTI, 2016).

Ao final do processo de maturação os espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo já são capazes de se mover progressivamente, entretanto a movimentação só tem início fisiologicamente durante a ejaculação quando os espermatozoides entram em contato com o plasma seminal (VARNER e JOHNSON, 2007). Mesmo que existam fatores inibitórios nos fluidos epididimários, é possível que a motilidade espermática seja suprimida pelo pH ácido desse ambiente. Sendo assim, o bicarbonato (HCO_3^-) é um fator chave para ativação da motilidade espermática e está praticamente ausente no fluido epididimário e presente em altas concentrações no plasma seminal (OKAMURA, TAJIMA, *et al.*, 1985; HOLT e HARRISON, 2002), podendo ser ainda maior em gananhões quando comparado a outros mamíferos (MANN e LUTWAK-MANN, 1981).

A segunda etapa, denominada capacitação espermática, ocorre já nos órgãos reprodutores femininos. Fisiologicamente essa etapa tem início no momento em que os espermatozoides são misturados ao plasma seminal durante o processo ejaculatório, sendo a parte caudal do oviduto, denominado de istmo, o principal local

de capacitação e armazenamento dos espermatozoides *in vivo* (TÖPFER-PETERSEN, EKHLASI-HUNDRIESER, *et al.*, 2005; VARNER e JOHNSON, 2011). A capacitação pode ser induzida *in vitro* através de meios quimicamente definidos ou centrifugação, técnicas utilizadas especialmente após a coleta seminal da cauda do epidídimo (PAPA, MELO, *et al.*, 2008). Durante a capacitação ocorre o efluxo de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide levando ao aumento da fluidez e permeabilidade da membrana aos íons bicarbonato (HCO_3^-) e cálcio (Ca^{2+}), hiperpolarização da membrana, alterações na fosforilação de proteínas e na atividade de proteínas quinase e aumento na concentração de bicarbonato e níveis intracelulares de pH, cálcio e monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) (ICKOWICZ, FINKELSTEIN e BREITBART, 2012).

Além disso, ocorre a hiperativação espermática, caracterizada pela alteração no padrão de movimentação dos espermatozoides, envolvendo batimentos flagelares assimétricos e movimentos rápidos e vigorosos da cauda (com a curvatura maior voltada para uma só direção) resultando em menor linearidade e aumento da amplitude do deslocamento (MORALES, OVERSTREET e KATZ, 1988; YANAGIMACHI, 1994). A hiperativação, considerada um marcador de capacitação espermática, é crucial para o sucesso da fertilização, permitindo que os espermatozoides atravessem o lúmen uterino sinuoso e repleto de conteúdo mucoso, além de possibilitar a libertação dos espermatozoides do epitélio do ovidutário (reservoir) e durante a penetração da zona pelúcida (VARNER e JOHNSON, 2011). Os conceitos de hiperativação e quimiotaxia, conceituada aqui como o padrão de movimentação espermática de acordo com o gradiente químico, são diferentes, entretanto, possivelmente dependentes. Ou seja, os espermatozoides mesmo que capazes de realizar movimentos com maior amplitude e assimetria, na ausência de indicadores químicos para direcioná-los, não são capazes de atingir o local de fertilização (CHANG e SUAREZ, 2010). Sabe-se que o aumento dos níveis citoplasmáticos de cálcio é crucial e até mesmo o principal mecanismo para hiperativação espermática, entretanto, a forma como ocorre esse influxo ainda não foi determinada (CHANG e SUAREZ, 2010).

A reação acrossomal é um processo irreversível cálcio-dependente que envolve a fusão da membrana plasmática com a membrana acrossomal externa, resultando na liberação de enzimas hidrolíticas acrossomais que permitem a penetração da zona pelúcida (COLENBRANDER e STOUT, 2011). Para que ocorra a

fertilização, o espermatozoide, após penetrar a matriz do complexo *cumulus oophorus* (CCO) se adere à zona pelúcida (ZP) dando início a reação acrossomal e após atravessar a ZP ocorre a fusão com o oolema (NIXON, AITKEN e MCLAUGHLIN, 2007). Apenas espermatozoides que sofreram reação acrossomal são capazes de realizar a fusão com a membrana plasmática do oócito (VARNER e JOHNSON, 2011).

Resumidamente, existem três pontos críticos de regulação da motilidade espermática: 1) durante o trânsito epididimário, onde ocorre a aquisição e supressão da motilidade; 2) no momento da ejaculação (a partir do contato com o plasma seminal), onde ocorre a ativação da motilidade progressiva caracterizada pelo movimento flagelar simétrico e com amplitude moderada resultando na trajetória propulsiva para frente; e 3) no trajeto pelo oviduto, onde ocorre a hiperativação espermática necessária para a fertilização.

Fertilidade

Ao contrário de outras espécies domésticas, em que o critério para seleção ou descarte dos animais é baseado em características reprodutivas de forma rigorosa, os equídeos são selecionados principalmente pelo pedigree e parâmetros fenotípicos de conformação e desempenho atlético esperados para cada raça (VARNER, 2016). Essa é uma das razões para haver atualmente uma porcentagem significativa de equinos que não satisfazem os critérios de alta qualidade seminal utilizado para outras espécies, levando a uma proporção expressiva de animais com baixa qualidade seminal e, conseqüentemente, baixos índices de fertilidade (HERNÁNDEZ-AVILÉS, ZAMBRANO-VARÓN e JIMÉNEZ-ESCOBAR, 2019).

É preciso considerar que o número de produtos gerados por um macho no intervalo de um ano é superior ao da fêmea e, mesmo que características reprodutivas sejam de baixa a moderada herdabilidade (AMANN e GRAHAM, 2011), a perpetuação para progênie de genes indesejáveis herdados do macho é mais expressiva e ponto crítico para o sucesso do melhoramento genético da espécie (COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003).

Dito isso, a fertilidade de um reprodutor pode ser determinada através de métodos diretos, como taxas de recuperação embrionária, prenhez, parto e potros nascidos vivos (WHITESELL, STEFANOVSKI, et al., 2020). Entretanto, fatores extrínsecos ao garanhão, como a disponibilidade e fertilidade das fêmeas, além da intensidade e qualidade do manejo, interferem nos resultados obtidos (FERNANDES

e PIMENTEL, 2002; COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003). Adicionalmente, precisam ser considerados o alto custo (manutenção do plantel, instalações e mão de obra) e lentidão uma vez que, a taxa de potros nascidos vivos de um determinado garanhão, por exemplo, só será determinada ao final da próxima estação reprodutiva (VAN BUITEN, VAN DEN BROEK, et al., 1999).

As técnicas de manejo reprodutivo podem elevar ou reduzir a fertilidade do macho quando usadas adequada ou inadequadamente, respectivamente. Dessa forma, a associação entre a qualidade espermática e a fertilidade é evidenciada quanto menor a interferência humana, mediante o uso de biotecnologias (HAMMES, PIMENTEL e FERNANDES, 1996). Dessa forma, o objetivo do exame andrológico, que avalia capacidade de cópula, libido, histórico reprodutivo, inspeção dos órgãos genitais internos e externos e avaliação da produção e qualidade espermática (VARNER, 2016) é determinar se um garanhão atende os requisitos para fertilidade adequada (COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003), no entanto, a fertilidade só pode ser evidentemente inferida por meio de teste de fertilidade.

O exame andrológico, apesar de apontar indivíduos com elevado grau de subfertilidade, é incapaz de diferenciar entre níveis moderados e altos de fertilidade (COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003). Além disso, devido à complexidade da fisiologia espermática e a gama de atributos que um espermatozoide precisa ter para ser capaz de fertilizar o oócito (VARNER e JOHNSON, 2007), nenhum parâmetro analisado individualmente se correlaciona satisfatoriamente com a fertilidade de um reprodutor a campo (WHITESELL, STEFANOVSKI, et al., 2020).

É necessário, portanto, determinar qual a melhor combinação de testes objetivos que juntos são capazes de prever a fertilidade de forma acurada de um macho (COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003). Mesmo técnicas avançadas de análise seminal como a análise computadorizada de motilidade espermática (CASA) e microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), que resultam na determinação mais conservadora da qualidade espermática quando comparada as análises convencionais, isoladamente não são capazes de determinar o potencial fértil de uma amostra seminal. Ainda nesse trabalho foi sugerido que a avaliação de morfologia espermática por microscopia DIC pode ser uma das análises mais importantes para predição da fertilidade (WHITESELL, STEFANOVSKI, et al., 2020). Além disso, foi reportado que pode existir um mecanismo compensatório de alguns parâmetros seminais em relação a fertilidade espermática. Por exemplo, ao se

comparar dois garanhões que apresentavam parâmetros de qualidade espermática iguais a 36 e 66% de motilidade total, 22 e 42% de motilidade progressiva e 77 e 53% de atividade mitocondrial (porcentagem de mitocôndria polarizada), respectivamente, pode-se notar taxas de prenhez por ciclo de 60 e 50%. Dessa forma, mesmo que o segundo garanhão apresente melhores parâmetros de motilidade, o primeiro possui maior potencial fertilizante devido à alta atividade mitocondrial, refletindo em maior potencial fertilizante de seus espermatozoides (BATTUT, KEMPFER, *et al.*, 2016). De acordo com esses autores, a combinação entre a observação microscópica, análise computadorizada de motilidade espermática (CASA), citometria de fluxo para análise de viabilidade, atividade mitocondrial, produção de ROS (espécies reativas de oxigênio), integridade acrossomal e de DNA e teste hiposmótico garante um alto nível de predição de fertilidade de um sêmen.

De acordo com o manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) de 2013, para o ejaculado de equinos ter um bom potencial fértil a fresco é esperado um volume de 40 a 60 mL, contendo aproximadamente 5 bilhões de espermatozoides totais com pelo menos 60% de motilidade e 70% de células morfolologicamente normais (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2013). Já para os jumentos é esperado ejaculado com volume entre 40 e 100 mL, contendo média de 20 a 30 bilhões de espermatozoides totais, motilidade igual ou maior que 70% e mais de 80% de células morfolologicamente normais (CANISSO, SOUZA, *et al.*, 2008).

Membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG)

A ligação espermática à zona pelúcida é uma importante etapa preliminar para o sucesso da fertilização e o teste de ligação à ZP pode ser útil para predição da habilidade fertilizante do sêmen *in vitro* (SINGER, LAMBERT, *et al.*, 1985; LIU, LOPATA, *et al.*, 1988). O teste de penetração *in vitro* de oócitos homólogos avalia a capacidade de ligação do espermatozoide aos oócitos de fêmeas da mesma espécie obtidos por aspiração folicular ou de abatedouros. Em humanos, uma taxa de ligação inferior a 30% é considerada anormal e indica que o paciente possui defeito na habilidade do espermatozoide de se ligar à ZP (HAMADA, NIZZA, *et al.*, 2012).

A partir da comparação entre o sêmen de garanhões férteis e subférteis (taxas de parto durante a estação reprodutiva >70% ou <70%, respectivamente), através do teste de penetração *in vitro* de oócitos homólogos criopreservados obtidos de abatedouros, foi encontrado que o número de espermatozoides ligados à zona

pelúcida foi maior para o grupo de garanhões férteis. Além disso, foi demonstrado que os espermatozoides móveis de garanhões subférteis são funcionalmente diferentes de espermatozoides móveis de garanhões férteis (MEYERS, LIU, *et al.*, 1996). Entretanto, a grande variação entre oócitos quanto a sua capacidade de ligação espermática é um fator limitante para o teste de ligação a oócitos para predição da capacidade espermática (FAZELI, STEENWEG, *et al.*, 1993; FAZELI, STEENWEG, *et al.*, 1993). Além disso, os procedimentos para coleta de oócitos, principalmente de éguas, podem ser onerosos, sendo difícil a coleta, de número satisfatório de oócitos de qualidade, com histórico de fertilidade conhecido da fêmea (SIEME, 2009).

O ensaio de hemizona tem como objetivo determinar a capacidade de ligação de duas amostras seminais a hemizonas correspondentes do mesmo oócito, eliminando o seu efeito sobre o número de ligações. Dessa forma, a origem dos oócitos (abatedouros ou aspiração folicular) e a variabilidade entre eles deixam de ser um entrave a esse teste de fertilidade *in vitro*. Nele, após a exposição das hemizonas às amostras seminais de interesse, é feita a contagem e comparação do número de espermatozoides ligados que só pode ser realizada entre as hemizonas correspondentes. Em equinos foi demonstrado que existe relação significativa entre o número de espermatozoides ligados à hemizona e a fertilidade *in vivo* (FAZELI, STEENWEG, *et al.*, 1995). Na prática, o ensaio de hemizona pode ser utilizado para avaliar a capacidade de ligação dos espermatozoides de um garanhão de fertilidade desconhecida através da comparação com a mesma capacidade de um garanhão com fertilidade conhecida, sob as mesmas condições de manejo (FAZELI, STEENWEG, *et al.*, 1995).

O teste de ligação espermática ao epitélio do oviduto demonstrou associação positiva entre a capacidade de ligação *in vitro* e a fertilidade tanto em bovinos quanto em suínos (DE PAUW, VAN SOOM, *et al.*, 2002; WABERSKI, MAGNUS, *et al.*, 2005). Em equinos o potencial de ligação dos espermatozoides obtidos do ejaculado e das diferentes regiões do epidídimo foi avaliado utilizando oviduto de vacas. Após a incubação, foi realizada a contagem do número de espermatozoides para o cálculo do número de espermatozoides ligados por explante de oviduto por mm². Os autores concluíram que esse teste heterólogo foi eficiente pela observação de células espermáticas interagindo com células do oviduto e a maior capacidade de ligação dos espermatozoides do ejaculado aos explantes de oviduto sugerem que o PS tem papel

importante no estabelecimento da reserva espermática no oviduto, mas não é imprescindível (CARNEIRO, MONTEIRO, *et al.*, 2017).

A membrana perivitelínica recobre o oócito de galinhas de maneira análoga à zona pelúcida de mamíferos (BAKST e HOWARTH JR., 1977). As glicoproteínas da zona pelúcida do oócito de mamíferos se assemelham com as glicoproteínas na membrana perivitelínica do oócito de aves, peixes e anfíbios (WASSARMAN, 2008). Portanto, o teste de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha, inicialmente realizado para avaliação da fertilidade de galos (OKAMURA e NISHIYAMA, 1978; BRAMWELL, MARKS e HOWARTH, 1995), foi o proposto também para avaliação de espécies domésticas e ameaçadas de extinção. A ligação espermatozoide-oócito tem a maior correlação (0.83; $p < 0,0001$) com a fertilidade do macho quando comparada com outras características espermáticas, como volume seminal e concentração espermática. Nesse estudo também foi observada relação dose resposta crescente entre o número de espermatozoides por poço e número de espermatozoides ligados à MPOG (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998).

Metodologicamente essa forma de avaliar *in vitro* a capacidade de ligação espermática foi adaptada entre os autores. Ao comparar características morfológicas da ligação de espermatozoides de mamíferos e galos à MPOG, foi observado que todos os espermatozoides estavam localizados em aposição à superfície interna da MPOG (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998). Dessa forma, o teste de penetração da membrana perivitelínica (MP) interna de ovos de galinha foi sugerido como mais eficiente que o teste de ligação a MP externa por refletir, além da capacidade de adesão do espermatozoide, a sua habilidade em sofrer reação acrossomal e hidrolisar a membrana. Nesse teste, as lâminas contendo as MP internas são observadas em microscópio de campo escuro, sob aumento de 200x, e três campos são fotografados para posterior contagem do número de orifícios que representam os pontos de hidrólise da membrana (CORCINI, DA SILVA, *et al.*, 2012).

A metodologia do teste de ligação à MPOG, tanto interna quanto externa, é baseada na contagem direta dos pontos de hidrólise e das células espermáticas aderidas, respectivamente, observadas através da microscopia. Portanto, diferente das avaliações de motilidade total e progressiva e do vigor consideradas subjetivas, o teste de ligação à MPOG pode ser considerado objetivo (DIAS, SANTOS, *et al.*, 2013). Em estudo com suínos da raça Piau foi observado que a concentração espermática e os meios de incubação não interferem na capacidade de adesão dos espermatozoides

à membrana perivitelínica interna da gema do ovo de galinha (PINHO, SHIOMI, *et al.*, 2012).

Foi observada correlação positiva ($p < 0,05$) entre a motilidade (0.3) e o vigor espermático (0.38) para o teste de ligação dos espermatozoides de caprinos à MPOG, após descongelamento (DIAS, SANTOS, *et al.*, 2013), entretanto a mesma correlação não foi observada em trabalho com sêmen canino em nenhum dos animais avaliados (VASCONCELOS, 2015). Além disso, apesar dos espermatozoides provenientes tanto do sêmen congelado quanto do descongelado serem capazes de se ligar à MPOG, existe uma redução ($p < 0,05$) de mais de 60% no número total de espermatozoides ligados à MPOG após o processo de criopreservação do sêmen em três dos quatro cães usados no experimento (VASCONCELOS, 2015).

Equinos versus asininos

Os asininos (*Equus asinus*), assim como os equinos (*Equus caballus*), são espécie domesticada da família *Equidae*. Essa espécie, assim como seus híbridos (muare) são economicamente muito importantes na América do Sul, África e Ásia, devido a facilidade de adaptação às regiões áridas e semiáridas (GASTAL, HENRY, *et al.*, 1996). Apesar das muitas semelhanças reprodutivas entre equinos e asininos, essas duas espécies apresentam diferenças quanto à anatomia e fisiologia do aparelho reprodutor, dessa forma, a transferência de técnicas reprodutivas desenvolvidas e consolidadas para uma podem não apresentar resultados satisfatórios para outra (WILDT, PUKAZHENTHI, *et al.*, 1995).

Anatomicamente, o pênis, os testículos e a cauda do epidídimo dos jumentos são maiores (NEVES, CHIARINI-GARCIA e FRANÇA, 2002; MCKINNON, SQUIRES, *et al.*, 2011). Além disso, apesar de ambas possuírem as quatro glândulas sexuais acessórias, o formato e o tamanho das mesmas entre as espécies são diferentes, afetando o volume seminal e, também, a qualidade espermática de forma distinta (PUGH, 2002; GACEM, 2020).

A duração da espermatogênese é de 57 dias em garanhões (AMANN, 2011) e de 47.2 dias em jumentos (NEVES, COSTA e FRANÇA, 2014). Contudo, a maior eficiência reprodutiva dos jumentos é explicada principalmente pela maior eficiência da célula de Sertoli, que se apresentam em maior número nessa espécie. A razão de espermátides por célula de Sertoli é de 15,1 para jumentos versus 8,7 para garanhões. Além disso, os asininos apresentam menor duração da espermatogênese e maior

porcentagem de túbulos seminíferos (NEVES, COSTA e FRANÇA, 2014). Dessa forma, produção diária de espermatozoides por grama de testículo em asininos é de, aproximadamente, 42 milhões, sendo a maior observada entre os animais domésticos já investigados e aproximadamente 110% maior que o valor descrito na literatura para garanhões (NEVES, COSTA e FRANÇA, 2014).

O plasma seminal de jumentos apresenta níveis mais altos de glicose, proteínas, lipídios, colesterol, cálcio e fósforo do que o plasma seminal de garanhões (TALLURI, MAL e RAVI, 2017) e as frações contendo proteínas de menor tamanho molecular (30-100 kDa) estão envolvidas na modulação da função espermática, inclusive na ligação entre espermatozoides e PMNs (MIRÓ, MARÍN, *et al.*, 2021). Como regra geral o ejaculado de jumentos apresenta maior concentração espermática e menor volume quando comparado com equinos, além disso, a fração gelatinosa é menor ou até mesmo ausente, observada principalmente em jumentos mais velhos, sendo influenciada pelo ambiente e manejo realizado (KREUCHAUF, 1984). O fluido das ampolas dos ductos deferentes de jumentos, em comparação aos garanhões, contém mais ergotioneína e acredita-se que esta atue protegendo os espermatozoides da ação de agentes oxidantes (MANN, LEONE e POLGE, 1956). Já a secreção proveniente da vesícula seminal das duas espécies é viscosa e possui alta concentração de ácido cítrico e ácido láctico (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Morfologicamente, a cabeça dos espermatozoides de equídeos é assimétrica e pode haver a inserção da cauda de forma abaxial, considerada como defeito em outros animais domésticos, essa característica é vista como normal nessa espécie (MEYERS, 2009). Apesar das similaridades entre as duas espécies, a cabeça dos espermatozoides de asininos é menor e a peça intermediária é maior, sugerindo uma correlação entre a morfometria e motilidade, em que os espermatozoides de jumentos além de mais rápidos apresentam maior movimento linear (MIRÓ, TABERNER, *et al.*, 2008).

Criopreservação seminal

O processo de criopreservação representa a interrupção artificial do processo pós-ejaculatório do espermatozoide em direção à capacitação e fertilização (WATSON, 1995) através da interrupção do seu metabolismo (AMANN e PICKETT, 1987). Essa ferramenta é de grande relevância para reprodução de equídeos pois otimiza o uso do macho, mesmo fora da estação de monta, reduz custos, risco de

acidentes e propagação de doenças, viabiliza o uso de animais de alto valor genético em escala global e por tempo ilimitado, além de permitir o aperfeiçoamento de outras biotecnologias (GRAHAM, 1996; MOORE, SQUIRES e GRAHAM, 2005; GRAHAM, 2011).

Por outro lado, há a necessidade de profissionais capacitados para a realização das etapas que envolvem essa biotecnologia desde o momento da coleta do sêmen, avaliação, congelamento e descongelamento até o manejo das fêmeas inseminadas para garantir melhor aproveitamento da técnica, além de aumento do custo do produto (LOOMIS e GRAHAM, 2008). Mas, os maiores desafios enfrentados, principalmente em ganhões, são a grande variabilidade na viabilidade espermática do sêmen descongelado entre animais (GRAHAM, 2011) e a redução da fertilidade em relação ao sêmen fresco (WATSON, 2000; LOOMIS e GRAHAM, 2008; GOVAERE, HOOGEWIJS, *et al.*, 2014).

Após a coleta de sêmen é necessária a remoção do plasma seminal e substituição por meio diluidor contendo crioprotetores (PAPA, MELO, *et al.*, 2008). Existem diversos diluentes comerciais e, apesar das diferenças em sua composição, os objetivos de todos eles são semelhantes: manter o equilíbrio osmótico, eletrolítico e de pH do meio, neutralizar produtos tóxicos provenientes do metabolismo espermático, fornecer energia e proteger os espermatozoides contra choques térmicos e inibir o crescimento bacteriano (ARRUDA, 2000; GRAHAM, 2011). Embora essenciais, quando em excesso os crioprotetores podem exercer efeitos tóxicos e reduzir os índices de fertilidade (WATSON, 2000).

Existe ainda um fator racial relacionado à resistência do sêmen ao processo de criopreservação. No Brasil as raças Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista são as que apresentam os piores índices de congelabilidade (ALVARENGA, PAPA e BURANTINI, 1996; FARRÁS, FIORATTI, *et al.*, 2014). A maior sensibilidade aos crioprotetores evidenciada pela menor resistência osmótica durante a criopreservação é apontada como uma justificativa na raça Mangalarga Marchador (MEDEIROS, 2007).

A formação e dissolução dos cristais de gelo durante a congelação e descongelação, respectivamente (HAMMERSTEDT, GRAHAM e NOLAN, 1990), assim como o estresse osmótico e tóxico causados pela exposição aos agentes crioprotetores provocam a diminuição da viabilidade espermática do sêmen criopreservado (WATSON, 2000). O conjunto de alterações na organização

bidimensional lipídica e proteica da membrana plasmática dos espermatozoides durante a criopreservação é denominado “choque frio” (AMANN e PICKETT, 1987).

A formação intracelular de cristais de gelo é a causa primária de dano celular durante o congelamento seminal em humanos, entretanto, foi observado que o sêmen de homens férteis, apesar de ser afetado por esse processo quanto a morfologia dos espermatozoides, parece não apresentar comprometimento da integridade do DNA espermático podendo ser utilizado para realização das técnicas de FIV ou ICSI. Em contrapartida, os espermatozoides de homens subférteis sofrem tanto alterações morfológicas quanto de integridade de DNA, comprometendo o sucesso dessas biotecnologias (DONNELLY, STEELE, *et al.*, 2001).

Além disso, a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas naturalmente durante a criopreservação do sêmen em níveis além dos considerados aceitáveis, promove danos mais acentuados. A peroxidação lipídica ocasionada pela interação entre os fosfolipídios da membrana espermática e as EROs, altera a fluidez e integridade da membrana plasmática reduzindo a capacidade fecundante (AITKEN, 1995). Além da criopreservação, espermatozoides anormais também são responsáveis pela produção de níveis mais elevados de EROs (BAUMBER, VO, *et al.*, 2002).

Devido à alta sensibilidade dos espermatozoides ao desafio osmótico a que são submetidos durante o processo de criopreservação, apenas uma proporção destes sobrevive. Comparando a fertilidade da população sobrevivente de espermatozoides com o número equivalente de espermatozoides frescos, a primeira apresenta menor fertilidade após inseminação no corpo do útero (WATSON, 1995). Esse resultado foi atribuído a motilidade, entretanto foi levantada a hipótese de que os espermatozoides após descongelamento são funcionalmente diferentes e apresentam reatividade de membrana semelhante à de espermatozoides capacitados. Esta capacitação prematura pode ser atribuída tanto a perda de lipídeos durante o congelamento-descongelamento quanto à remoção de fatores decapacitantes do plasma seminal por centrifugação (WATSON, 1995).

Plasma seminal

O ejaculado é constituído pelo plasma seminal (PS), secretado majoritariamente pelas glândulas sexuais acessórias, e pelos espermatozoides, produzidos nos testículos. Os equídeos possuem os quatro tipos glandulares, sendo

eles, próstata, bulbouretrais, vesículas seminais e ampolas do ducto deferente (CHENIER, 2009). As três frações espermáticas liberadas durante a ejaculação de equídeos têm composições e funções diferentes. A primeira fração (pré-espermática) possui aparência aquosa, é responsável pela limpeza uretral e é composta principalmente pelo fluido das bulbouretrais, possui nenhum ou poucos espermatozoides. A segunda fração (espermática) possui aparência leitosa, é rica em espermatozoides, glicerilfosforilcolina e ergotioneína, e é composta em grande parte pelos fluidos da próstata e das ampolas. A terceira fração (pós-espermática) é pobre em espermatozoides e é composta, principalmente, pela secreção das glândulas vesiculares no caso de equídeos, tem característica gelatinosa e arrasta os espermatozoides que restam na uretra após a ejaculação (CHENIER, 2009; KATILA, 2011; AMANN e GRAHAM, 2011).

A secreção das bulbouretrais de garanhões, assim como em varrões, apresenta atividade considerável da enzima lipase, potencialmente prejudicial a motilidade espermática durante o resfriamento, especialmente para alguns garanhões (CHENIER, 2009). O conteúdo das vesículas seminais de garanhões é composto predominantemente por ácido cítrico e láctico, enquanto que em outras espécies a frutose e ergotioneína são mais prevalentes (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Em humanos, a adição de plasma seminal inicia imediatamente a motilidade progressiva de espermatozoides coletados do epidídimo. Enquanto a adição exclusiva do fluido vesicular apresentou efeito negativo na motilidade e sobrevivência espermática, a adição exclusiva de fluido prostático ou albumina aos espermatozoides promoveu ótima motilidade progressiva e proteção contra os efeitos do fluido vesicular (LINDHOLMER, 1974). Em garanhões também foi observado efeito negativo mais pronunciado sobre a longevidade do sêmen após a adição da fração produzida pela vesícula seminal do plasma seminal (SIEME, KATILA e KLUG, 2004).

Mesmo que estudos questionem a necessidade do plasma seminal para a fecundação, visto que espermatozoides coletados da cauda do epidídimo que não tiveram contato com essas secreções são capazes de fertilizar o oócito (YU e LEIBO, 2002; PAPA, MELO, *et al.*, 2008), as funções do plasma seminal são abrangentes e não se restringem apenas aos espermatozoides. As proteínas presentes no plasma seminal exercem múltiplos efeitos fundamentais para o sucesso da fertilização, tais como, a regulação positiva e negativa da capacitação espermática (fatores decapacitantes e estimulatórios), transporte dos espermatozoides do local de

inseminação até a tuba uterina, estabelecimento da reserva espermática no oviduto, modulação da resposta imune fisiológica uterina pós cobertura, e na interação entre gametas masculino e feminino durante o processo de fusão (TROEDSSON, DESVOUSGES, *et al.*, 2005).

A concentração proteica presente do plasma seminal de equinos é de aproximadamente 10 mg/ml, relativamente baixa quando comparada com outras espécies de mamíferos em que a concentração varia entre 20 e 60 mg/ml (TÖPFER-PETERSEN, EKHLASI-HUNDRIESER, *et al.*, 2005; CHENIER, 2009). A composição do plasma seminal pode influenciar na estabilidade da membrana espermática e, apesar de estudos sobre o efeito de seus componentes ainda serem contraditórios, sabe-se que é um fator que varia entre indivíduos e determina a aptidão de gametas para a criopreservação (AURICH, KUHNE, *et al.*, 1996; BRINSKO, CROCKETT e SQUIRES, 2000).

As células espermáticas são especialmente sensíveis ao estresse oxidativo que causam lesões mitocondriais, fragmentação de DNA, capacitação espermática precoce, peroxidação lipídica das membranas celulares e indução de apoptose (VIGNERA, VICARI, *et al.*, 2011). O plasma seminal possui efeito antioxidante e as principais enzimas presentes nessa secreção são a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (BALL, 2011). A catalase está presente em alta quantidade no plasma seminal de equinos e é fundamental para degradação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (BAUMBER, VO, *et al.*, 2002).

Em condições de monta natural machos equídeos ejaculam diretamente no lúmen uterino, o plasma seminal, que além de desempenhar importante papel na sobrevivência de espermatozoides viáveis também atua na eliminação de espermatozoides não viáveis do útero através do estímulo à fagocitose e ligação com polimorfonucleares (PMN) (TROEDSSON, DESVOUSGES, *et al.*, 2005). Estudos recentes buscam elucidar se a adição de plasma seminal ao sêmen descongelado pode melhorar as taxas de concepção de jumentas, visando a modulação da resposta inflamatória pós inseminação que nessa espécie é mais intensa e se assemelha ao quadro de endometrite persistente pós cobertura de éguas (MIRÓ, MORATÓ, *et al.*, 2020; MIRÓ, MARÍN, *et al.*, 2021).

A maioria dos protocolos utilizados para criopreservação do sêmen de equídeos prevê a remoção do PS por centrifugação e substituição por diluentes, julgando necessário para manutenção da qualidade e longevidade das células

espermáticas (AMANN e PICKETT, 1987; LOVE, BRINSKO, *et al.*, 2005; KARESKOSKI, REILAS, *et al.*, 2006). Foi observado que a adição de plasma seminal previamente à criopreservação protege os espermatozoides de equinos quanto a peroxidação lipídica devido ao seu efeito antioxidante, entretanto em concentrações superiores a 25% o plasma seminal causa redução na viabilidade espermática (ALMEIDA, 2006). Em outro experimento com equinos, a adição de 20% de PS resultou em maior porcentagem de espermatozoides móveis em relação ao grupo em que todo o PS foi removido previamente ao congelamento (KATILA, ANDERSSON, *et al.*, 2002).

Em estudo comparativo sobre a influência das diferentes frações do plasma seminal sobre a qualidade espermática do sêmen descongelado, foi sugerido que a não remoção do plasma seminal, especialmente da fração rica em espermatozoides, melhorou a motilidade pós descongelamento. Adicionalmente, sua completa remoção, apesar de não afetar a IMP, resultou em menor motilidade total pós descongelamento (KARESKOSKI, REILAS, *et al.*, 2006).

O efeito da origem do plasma seminal, ou seja, de garanhões bons ou maus congeladores, foi apontado em alguns trabalhos. A adição previamente ao congelamento de 30% de PS de garanhões com alta motilidade pós descongelamento ($MP \geq 30\%$) ao sêmen de garanhões com baixa motilidade pós descongelamento ($MP \leq 20\%$) aumentou significativamente a IMP (27 ± 2.1 para $34.3 \pm 2.3\%$) e MP (24 ± 1.6 para $34.5 \pm 1.9\%$). Assim como a adição de 30% do PS de animais com baixa motilidade pós descongelamento ao sêmen de animais com alta motilidade pós descongelamento provocou diminuição significativa da MP (36 ± 1.6 para $30 \pm 2.7\%$), mas não interferiu na IMP, demonstrando a influência do PS na resistência/susceptibilidade dos espermatozoides ao processo de criopreservação (AURICH, KUHNE, *et al.*, 1996).

Em outro estudo, a adição de 5% de PS de garanhões bons congeladores ($MT \geq 50\%$ e $MP \geq 30\%$) antes da criopreservação resultou na redução do número de espermatozoides ligados à ZP de oócitos bovinos após descongelamento quando comparado ao grupo sem adição de PS ou ao grupo com adição de 5% de PS de garanhões maus congeladores ($MT \leq 50\%$ e $MP \leq 30\%$). Além disso, a exposição de espermatozoides congelados de forma convencional a 5% do PS tanto de bons quanto de maus congeladores após o descongelamento diminuiu significativamente a capacidade de ligação espermática ao oócito bovino em relação ao grupo sem

exposição ao PS, Adicionalmente, a exposição prolongada reduziu drasticamente a afinidade de ligação, demonstrando que as células espermáticas também são afetadas pelo tempo de exposição ao PS (AL-ESSAWE, WALLGREN, *et al.*, 2018). Também relacionado ao tempo de exposição, em estudo com garanhões, a adição de PS apresentou pouco efeito na motilidade e viabilidade espermática quando o congelamento foi realizado imediatamente após a coleta e processamento. Por outro lado, quando os espermatozoides permaneceram incubados por longos períodos com 20% de PS (v:v) antes do congelamento, o conteúdo das glândulas sexuais acessórias apresentou efeito prejudicial à sobrevivência dos espermatozoides equinos (MOORE, SQUIRES e GRAHAM, 2005).

Ainda considerando a origem do PS, a adição após o descongelamento de PS autólogo de garanhões com média e baixa resistência ao congelamento (MT=20-40% e MT<20% após o descongelamento, respectivamente), resultou em aumento nos parâmetros de motilidade. Além disso, a adição de 25% de PS pareceu ser benéfica em relação à adição de 50% (NEUHAUSER, GOSELE e HANDLER, 2019). A adição de 20% de PS, tanto autólogo quanto heterólogo, ao sêmen descongelado previamente à IA pode aumentar as taxas de fertilidade, visto que foi observado, simultaneamente, o aumento da população com integridade de membrana plasmática e acrossomal em relação ao grupo sem adição de PS (ANDRADE, ZAFFALON, *et al.*, 2011). Em estudo com sêmen descongelado de epidídimo foi observado que a adição de 50% de PS por 15 minutos não causa nem benefícios nem malefícios a qualidade do sêmen coletado do epidídimo de garanhões (MIRÓ, MORATÓ, *et al.*, 2020).

Em humanos foi observada maior porcentagem de espermatozoides móveis nas amostras com maior adição de plasma seminal (50 e 75%) após o descongelamento, em comparação com amostras em que essa adição foi menor (5 e 25%). Foi sugerido, então, que a adição de plasma seminal aos crioprotetores em uma concentração específica é útil no aumento da viabilidade do sêmen humano criopreservado (BEN, FU, *et al.*, 1997).

OBJETIVO GERAL

- ✓ Validar o teste heterólogo de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha para equinos e asininos, como método para determinação da capacidade fertilizante do sêmen.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Testar duas doses inseminantes — dose de 10 milhões de espermatozoides totais e de 50 milhões de espermatozoides totais — para determinar qual é a mais apropriada para o teste de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha para equinos e asininos;
- ✓ Avaliar a influência da adição de plasma seminal no potencial de ligação dos espermatozoides de equinos e asininos à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha;
- ✓ Avaliar o potencial de ligação espermática à MPOG do sêmen fresco e do sêmen congelado de equinos e asininos.

HIPÓTESES

O teste de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha pode ser utilizado para avaliação funcional *in vitro* dos espermatozoides de equinos e asininos.

O potencial de ligação espermática à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha é dose-dependente.

O sêmen congelado de equídeos apresenta menor potencial de ligação espermática à membrana perivitelínica do ovo de galinha em comparação ao sêmen fresco.

A adição de plasma seminal após o congelamento seminal melhora a capacidade ligante de espermatozoides de equídeos à membrana perivitelínica do ovo de galinha.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, 7, 1995. 659-668.
- AL-ESSAWE, E. M. et al. Seminal plasma influences the fertilizing potencial of cryoprerved stallion sperm. **Theriogenology**, 115, 2018. 99-107.
- ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. Universidade de Brasília. Brasília, p. 90. 2006.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; BURANTINI, J. **The effect of breed spermatic parameters over equine semen freezability**. Proceedings Symposium on Stallion Semen. Amersfoort: [s.n.]. 1996. p. 82.
- AMANN, R. P. Physiology and Endocrinology. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. 2ª. ed. [S.I.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 96, p. 881-908.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. 2ª. ed. [S.I.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 102, p. 1053-1084.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopresevation and a review of cryopreservation of stallion apermatozoa. **Special Review**, 7, n. 3, 1987.
- ANDRADE, A. F. C. et al. Additions of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, 46, 2011. 682-686.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas de motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. FMVZ - Universidade de São Paulo. São Paulo, p. 120. 2000.
- AURICH, J. E. et al. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, 46, 1996. 791-797.
- BAKST, M. R.; HOWARTH JR., B. Hydrolysis of the hen's perivitelline layer by cock sperm in vitro. **Biology of Reproduction**, 17, 1977. 370-379.

- BALL, B. A. Oxidative stress in sperm. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. 2^a. ed. [S.I.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 98, p. 991-995.
- BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, 58, 1998. 686-699.
- BATTUT, I. B. et al. Development of a new fertility prediction model for stallio semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, 86, 2016. 1111-1131.
- BAUMBER, J. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, 57, 2002. 1025-1033.
- BEN, W. X. et al. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm. **Archives of Andrology**, 39, n. 3, 1997. 211-216.
- BRAMWELL, R. K.; MARKS, H. L.; HOWARTH, B. Quantitative determination of spermatozoa penetration of the perivitelline layer of the hen's ovum assessed on oviposited eggs. **Poultry Science**, 74, 1995. 1875-1883.
- BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, 54, 2000. 129-136.
- CARNEIRO, J. A. M. et al. Heterologous oviductal cells binding capacity of cryopreserved equine ejaculated and epididymal spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, 59, 2017. 40-48.
- CHANG, H.; SUAREZ, S. S. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, 83, 2010. 507-513.
- CHENIER, T. S. Anatomy and physical examination of the stallion. In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. 2^a. ed. [S.I.]: Saunders Elsevier, 2009. Cap. 1, p. 1-16.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COLENBRANDER, B.; STOUT, T. A. E. Evaluation of the plasma membrane. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. [S.l.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 153, p. 1498-1505.

CORCINI, C. D. et al. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo de galinha. **Ciência Rural**, 42, n. 1, 2012. 142-146.

DE PAUW, I. M. C. et al. Sperm binding to epithelial explants in bulls with different non-returns rates investigated with a new in vitro model. **Biology of Reproduction**, 67, 2002. 1073-1079.

DIAS, J. C. O. et al. Teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo após adição de ringer lactato, citrato de sódio 2,92% e solução TRIS no sêmen caprino descongelado. **Acta Veterinaria Brasilica**, 7, n. 4, 2013. 300-305.

DONNELLY, E. T. et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, 6, 2001. 1191-1199.

FARRÁS, M. C. et al. Comparação de diferentes temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. **Veterinária e Zootecnia**, 21, n. 1, 2014. 187-195.

FAZELI, A. R. et al. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. **Veterinary Record**, 132, 1993. 14-16.

FAZELI, A. R. et al. Use of sperm binding to homologous hemizona pellucida to predict stallion fertility. **Equine Veterinary Journal**, Suppl. 15, 1993. 57-59.

FAZELI, A. R. et al. Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. **Theriogenology**, 44, 1995. 751-760.

FOUCHÉCOURT, S. et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, 62, 2000. 1790-1803.

GACEM, S. **Computerised analysis of semen in equids**. Universitat Autònoma de Barcelona. [S.l.], p. 152. 2020.

- GASTAL, M. O. et al. Sexual behavior of donkey jacks: influence of ejaculatory frequency and season. **Theriogenology**, 46, 1996. 593-603.
- GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes occurring and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, 5, 2016. 204-218.
- GOVAERE, J. L. J. et al. Effect of artificial insemination protocol and dose of frozen/thawed stallion semen on pregnancy results in mares. **Reproduction in Domestic Animal**, 49, 2014. 487-491.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, 12, n. 1, 1996. 131-146.
- GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. 2^a. ed. [S.I.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 127, p. 1308-1315.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7^a. ed. Barueri: Manole Ltda., 2004.
- HAMADA, A. et al. Unexplained male infertility: diagnosis and management. **International Braz J Urol.**, 38, 2012. 576-594.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, 11, 1990. 73-88.
- HOLT, W. V.; HARRISON, R. A. Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via a protein kinase a-dependent path-way: between-cell and between ejaculate differences are not due to defeciencies in protein kinase A activation. **Journal of Andrology**, 23, 2002. 557-565.
- ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, 14, 2012. 816-821.
- KARESKOSKI, A. M. et al. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractioned stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, 41, 2006. 33-38.
- KATILA, T. Sperm-Uterine Interactions. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. 2^a. ed. [S.I.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 104, p. 1092-1098.

KATILA, T. et al. Post-thaw motility and viability of fractioned and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, 58, 2002. 241-244.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**, n. 20, 1984. 51-78.

LINDHOLMER, C. H. The importance of seminal plasma for human sperm motility. **Biology of Reproduction**, 10, 1974. 533-542.

LIU, D. Y. et al. A human sperm-zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. **Fertility and Sterility**, 50, n. 5, 1988. 782-788.

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

LOVE, C. C. et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, 63, 2005. 1584-1591.

MANN, T.; LEONE, E.; POLGE, C. The composition of the stallion's semen. **Journal of endocrinology**, 13, 1956. 279-290.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids: application to andrological problems. In: MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproductive Function and Semen**. [S.I.]: Springer-Verlag, 1981. Cap. IX, p. 269-336.

MCKINNON, A. O. et al. (Eds.). **Equine Reproduction**. 2^a. ed. New Delhi: Wiley-Blackwell, v. 2, 2011.

MEDEIROS, A. S. L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores**. Universidade Estadual Paulista - UNESP. Botucatu, p. 118. 2007.

MEYERS, S. A. Sperm physiology. In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. 2^a. ed. [S.I.]: Saunders Elsevier, v. 1, 2009. Cap. 5, p. 47-55.

MEYERS, S. A. et al. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, 46, 1996. 1277-1288.

MIRÓ, J. et al. **Morphometry and motility of donkeys spermatozoa vs horse spermatozoa**. 1st International Meeting AERA-BAS. [S.l.]: [s.n.]. 2008. p. 75.

MIRÓ, J. et al. Preservation of epidymal stallion sperm in liquid and frozen states: effects of seminal plasma on sperm function and fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, 88, 2020. 102940.

MIRÓ, J. et al. Seminal plasma, sperm concentration, and sperm-PMN interaction in the donkey: an in vitro model to study endometrial inflammation post-insemination. **International Journal of Molecular Sciences**, 21, 2021. 3478.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, 63, 2005. 2372-2381.

MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; KATZ, D. F. Changes in human sperm motion during capacitation in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, 83, 1988. 119-128.

NEUHAUSER, S.; GOSELE, P.; HANDLER, J. Postthaw addition of autologous seminal plasma improves sperm motion characteristics in fair and poor freezer stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, 72, 2019. 117-123.

NEVES, E. M.; COSTA, G. M. J.; FRANÇA, L. R. Sertoli cell and spermatogenic efficiencies in Pêga Donkey (*Equus asinus*). **Animal Reproduction**, 11, n. 4, 2014. 517-525.

NEVES, E. S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L. R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, 67, 2002. 247-255.

NIXON, B.; AITKEN, R. J.; MCLAUGHLIN, E. A. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 64, 2007. 1805-1823.

OKAMURA, F.; NISHIYAMA, H. The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. **Cell and Tissue Research**, 188, 1978. 497-508.

OKAMURA, N. et al. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. **Journal of Biological Chemistry**, 260, 1985. 9699-9705.

PAPA, F. O. et al. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, 107, 2008. 293-301.

PINHO, R. O. et al. Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 36, n. 4, 2012. 245-249.

PUGH, D. G. **Donkey Reproduction**. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. [S.l.]: [s.n.]. 2002. p. 113-114.

SIEME, H. Semen Evaluation. In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding, Management and Artificial Insemination**. 2^a. ed. [S.l.]: Saunders, v. 1, 2009. Cap. 6, p. 57-74.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, 61, 2004. 769-784.

SINGER, S. L. et al. The kinetics of human sperm binding to the human zona pellucida and zona-free hamster oocyte in vitro. **Gamete Research**, 12, 1985. 29-39.

TALLURI, T. R.; MAL, G.; RAVI, S. K. Biochemical components of seminal plasma and their correlation to the seminal characteristics in Mawari stallions and Poitou jacks. **Veterinary World**, 10, n. 2, 2017. 214-220.

TÖPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, n. 89, 2005. 159-170.

TOSHIMORI, K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. **Microscopy Research and Technique**, 61, 2003. 1-6.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, 89, 2005. 171-186.

- VARNER, D. D.; JOHNSON, L. **From a sperm's eye view - revisiting our perception of this intriguing cell**. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. [S.I.]: [s.n.]. 2007. p. 104-177.
- VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: revisiting our perception of this intriguing cell. In: MCKINNON, A. O., et al. **Equine Reproduction**. 2^a. ed. [S.I.]: Wiley-Blackwell, v. 1, 2011. Cap. 97, p. 909-990.
- VASCONCELOS, G. D. S. C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de cão (*Canis lupus familiares*)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 60. 2015.
- VIGNERA, S. et al. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). **International Journal of Andrology**, 34, 2011. 330-347.
- WABERSKI, D. et al. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. **Theriogenology**, 63, n. 2, 2005. 470-484.
- WASSARMAN, P. M. Zona pellucida glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, 283, n. 36, 2008. 24285-24289.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, 7, 1995. 871-891.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60-61, 2000. 481-492.
- WILDT, D. et al. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction, Fertility and Development**, 7, 1995. 811-824.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **Physiology of Reproduction**. [S.I.]: Raven Press, 1994. p. 189-317.
- YU, I.; LEIBO, S. P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, 57, 2002. 1179-1190.

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo redigido segundo as normas da revista Theriogenology, ISSN 0093-691X, classificada como A1 pelo QUALIS – CAPES 2022.

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DO SÊMEN DE EQUÍDEOS PELO TESTE DE LIGAÇÃO ESPERMÁTICA À MEMBRANA PERIVITELÍNICA DO OVO DE GALINHA

Carolina Silveira Fontes^a, Marcela Souza e Freitas^a, Henry David Mogollón García^b, Cristian Silva Teixeira^a, Leandro Licursi de Oliveira^c, Tarcízio Antonio Rêgo de Paula^d, Yame Fabres Robaina Sancler-Silva^a

^aDepartamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

^bDepartamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, Cidade Universitária - Butantã 05508-900, São Paulo, São Paulo, Brasil;

^cDepartamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil;

^dDepartamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

*Corresponding author, email: carolina.s.fontes@ufv.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi validar a técnica de ligação espermática à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG) em duas doses inseminantes (DIs) para equinos e asininos. Posteriormente, objetivou-se avaliar a influência do plasma seminal e da criopreservação na capacidade de ligação *in vitro* de espermatozoides de ambas as espécies. No experimento I, comparou-se a capacidade de ligação à MPOG de amostras seminais com viabilidades espermáticas (VEs) de 0, 25, 50 e 75 e 100% e doses inseminantes de 10 milhões (DI10) e 50 milhões (DI50) de espermatozoides totais por aparato. No experimento II, comparou-se a capacidade de ligação à MPOG de amostras seminais frescas e congeladas, acrescidas ou não de plasma seminal, constituindo quatro grupos experimentais: sêmen fresco sem plasma

seminal (SFSPS), sêmen fresco com plasma seminal (SFCPS), sêmen descongelado sem plasma seminal (SDSPS) e sêmen descongelado com plasma seminal (SDCPS). Todas as comparações entre médias foram avaliadas utilizando o pacote PROC GLIMMIX, sendo considerada diferença estatística quando $p < 0,05$ e tendência quando $0,05 < p < 0,1$. A capacidade de ligação dos espermatozoides à MPOG foi influenciada pela DI utilizada e pela espécie, sendo maior para asininos e para a DI10. Quando a espécie foi desconsiderada, o teste permitiu diferenciar o potencial de ligação entre partidas seminais inférteis (0% de VE) em relação a partidas que apresentavam potencial fértil ($\geq 25\%$ de VE). No entanto, não permitiu diferenciar o potencial de ligação de partidas com menores e maiores VEs (25, 50 e 75%). Para ambas as espécies, a partida seminal descongelada apresentou maior capacidade de ligação espermática à MPOG em relação a partida seminal fresca, além disso a adição de 10% plasma seminal (v/v) não interferiu nessa ligação. Em conclusão, o teste de ligação à MPOG pode ser utilizado para avaliação do potencial *in vitro* da capacidade de ligação espermática de equídeos. Estudos adicionais quanto a dose inseminante, tempo de incubação pós inseminação dos aparatos e número de repetições por amostra seminal são requeridos visando uma maior acurácia do teste.

Palavras-chave: espermatozoide, fertilidade *in vitro*, avaliação seminal, garanhão, jumento.

ABSTRACT

The objective of this work was to validate the sperm binding technique to the perivitelline membrane of chicken egg yolk (MPOG) in two inseminating doses (DIs) for horses and donkeys. Subsequently, the objective was to evaluate the influence of seminal plasma and cryopreservation on the *in vitro* binding capacity of sperm from both species. In experiment I, the MPOG binding capacity of seminal samples with sperm viabilities (VEs) of 0, 25, 50 and 75 and 100% and inseminating doses of 10 million (DI10) and 50 million (DI50) of total spermatozoa per apparatus. In experiment II, the MPOG binding capacity of fresh and frozen seminal samples, with or without the addition of seminal plasma, was compared, constituting four experimental groups: fresh semen without seminal plasma (SFSPS), fresh semen with seminal plasma (SFCPS), frozen semen without seminal plasma (SDSPS) and frozen semen with seminal plasma (SDCPS). All comparisons between means were evaluated using the PROC GLIMMIX package, considering a statistical difference when $p < 0.05$ and

tendency when $0.05 < p < 0.1$. The binding capacity of sperm to MPOG was influenced by the DI used and the species, being greater for donkeys and DI10. When the species was disregarded, the test made it possible to differentiate the binding potential between infertile seminal batches (0% VE) in relation to batches that had fertile potential ($\geq 25\%$ VE). However, it did not allow differentiating the connection potential of starters with smaller and larger VEs (25, 50 and 75%). For both species, the frozen seminal batch showed greater sperm binding capacity to MPOG compared to the fresh seminal batch. Furthermore, the addition of 10% seminal plasma (v/v) did not interfere with this binding. In conclusion, the MPOG binding test can be used to evaluate the *in vitro* potential of equine sperm binding capacity. Additional studies regarding the inseminating dose, post-insemination incubation time of the apparatus and number of repetitions per seminal sample are required to achieve greater test accuracy.

Keywords: spermatozoa, *in vitro* fertility, semen evaluation, stallion, donkey.

INTRODUÇÃO

A fertilidade de um reprodutor é determinada por meio de métodos diretos como a taxa de prenhez e taxa de natalidade (PIMENTEL, 1989). Contudo, testes de fertilidade *in vivo* são demorados, onerosos e sofrem influência de fatores extrínsecos ao garanhão, como disponibilidade e fertilidade das fêmeas, assim como a intensidade do manejo realizado (COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003). Dessa forma, testes *in vitro* que avaliam, direta ou indiretamente a capacidade fertilizante dos espermatozoides, podem ser importantes ferramentas quando associados às técnicas rotineiras de avaliação seminal como cinética espermática, integridade de membrana e morfologia espermática (BRITO, LOSANO, *et al.*, 2017).

Os espermatozoides dos mamíferos ao serem depositados no trato genital feminino passam por diversas alterações bioquímicas denominadas coletivamente de capacitação. Durante a fertilização, o espermatozoide capacitado penetra no *cumulus oophorus* e então se liga à zona pelúcida (ZP) do oócito com sua membrana plasmática intacta. Após se ligar à ZP, o espermatozoide sofre um processo exocitótico denominado reação acrossômica. Esse evento possibilita a passagem do espermatozóide pela ZP e sua posterior fusão com o oolema (ICKOWICZ, FINKELSTEIN e BREITBART, 2012). A glicoproteína ZP3 presente na zona pelúcida do oócito de mamíferos, componente chave na ligação acrossomal espécie específica durante a fertilização, apresenta homologia com a MPOG (OKAMURA e NISHIYAMA,

1978; WACLAWEK, FOISNER, *et al.*, 1998). Assim, o teste de ligação à membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG) permite inferir sobre a capacidade de ligação de espermatozoides à zona pelúcida, que constitui uma das etapas do processo de fertilização, sendo considerado um teste de funcionalidade do espermatozoide.

Esse teste se mostrou viável para avaliar a capacidade fertilizante de espermatozoides caninos, em associação aos testes rotineiros de avaliação espermática (CSERMAK JUNIOR, 2011; BRITO, LOSANO, *et al.*, 2017). Em suínos, o teste se mostrou mais adequado ao utilizar a MPOG interna em relação à externa, por refletir a capacidade do espermatozoide em sofrer reação acrossomal e hidrolisar a membrana, ao invés de somente avaliar sua capacidade de ligação (CORCINI, DA SILVA, *et al.*, 2012). Entretanto, na mesma espécie, não foi observada diferença no potencial de ligação à MPOG entre indivíduos, independente da concentração espermática e meios de incubação utilizados (PINHO, SHIOMI, *et al.*, 2012). Por outro lado, em humanos, o percentual de espermatozoides ligados à MPOG foi dose-dependente decrescente, ou seja, quanto maior a concentração menor a capacidade de ligação devido ao aumento da competição (AMANN, SHABANOWITZ, *et al.*, 1999).

Quando avaliado o efeito da criopreservação, observou-se maior número de espermatozoides de galo ligados à MPOG para o sêmen fresco em relação ao descongelado, sugerindo que danos celulares causados durante à criopreservação reduzem a capacidade de ligação espermática nessa espécie (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998). Já para caprinos não foi observada diferença quanto à capacidade de ligação à MPOG entre o sêmen fresco e descongelado, podendo ser utilizado esse teste em substituição ao teste de ligação ao oócito caprino (SANTOS, 2010). Avaliando felídeos, a criopreservação não foi deletéria para a capacidade de ligação dos espermatozoides de jaguatiricas à MPOG, no entanto, para o gato-domato-pequeno foi observado menor número de espermatozoides ligados após o descongelamento (ARAÚJO, 2012; GARAY, 2012).

A criopreservação do sêmen é uma importante biotecnologia aplicada na reprodução de equídeos, uma vez que reduz o risco de acidentes e transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, viabiliza o uso de animais de alto valor genético em escala global, permite o armazenamento do sêmen por tempo indeterminado e acelera o ganho genético (SAMPER, HELLANDER e CRABO, 1991). Esse processo exige a diminuição ou interrupção do metabolismo celular e apresenta implicação

direta no funcionamento da membrana espermática (PARKS e GRAHAM, 1992). Além disso, a maioria dos protocolos utilizados para criopreservação do sêmen de equídeos prevê a remoção do PS, mediante centrifugação e substituição por diluentes (AMANN e PICKETT, 1987; LOVE, BRINSKO, *et al.*, 2005; KARESKOSKI, REILAS, *et al.*, 2006).

O plasma seminal (PS) de mamíferos é uma secreção fisiológica proveniente da rede testis, epidídimos e glândulas acessórias do aparelho reprodutor masculino (TROEDSSON, DESVOUSGES, *et al.*, 2005). Dentre os componentes que compõem esse complexo fluido estão proteínas, que exercem importante papel na capacidade fertilizante dos espermatozoides (MANASKOVA, BALINOVA, *et al.*, 2003). De modo geral, as funções de proteínas específicas do plasma seminal incluem o seu envolvimento nos passos iniciais e centrais do processo de fertilização, como a regulação da capacitação, o estabelecimento do reservatório espermático na tuba uterina, a modulação da resposta imune no útero, o transporte espermático no trato reprodutor da fêmea e a interação e fusão com o oócito (TOPFER-PETERSEN, EKHLASI-HUNDRIESER, *et al.*, 2005). Apesar disso, não existe consenso na literatura quanto ao efeito da adição de PS ao sêmen descongelado de machos equídeos, uma vez que já foi reportado tanto efeito positivo quanto negativo, além da ausência de efeito na qualidade e fertilidade espermática, devendo ainda ser considerada a origem do PS (machos com menor ou maior sensibilidade espermática à criopreservação) (ANDRADE, ZAFFALON, *et al.*, 2011; AL-ESSAWE, WALLGREN, *et al.*, 2018; NEUHAUSER, GOSELE e HANDLER, 2019; MIRÓ, MORATÓ, *et al.*, 2020).

Dessa forma, este estudo objetivou responder as seguintes perguntas: (1) O teste de ligação espermática à MPOG pode ser utilizado para avaliar a funcionalidade dos espermatozoides equinos e asininos? (2) A dose inseminante interfere no potencial de ligação de espermatozoides de equídeos à MPOG? (3) A adição de 10% de plasma seminal ao sêmen fresco e descongelado influencia no potencial de ligação de espermatozoides de equídeos à MPOG?

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos do estudo

Os animais utilizados nesse estudo foram manejados de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

(CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV), conforme o protocolo nº. 44/2022.

Animais e local do estudo

Seis machos equídeos (3 equinos Mangalarga Marchadores e 3 jumentos Pêga), com idades entre 3-9 anos, pesando entre 400-600 Kg e escore de condição corporal moderado (escore $\geq 5,5$) (HENNEKE, POTTER, *et al.*, 1983) hípidos e com fertilidade conhecida, foram utilizados de novembro a dezembro no hemisfério sul (Latitude 20° 44' 58" S e Longitude 42° 51' 10" O). Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de manejo, em baias individuais com livre acesso a piquete de gramínea (*Paspalum notatum*), suplementados com capim cortado (*Pennisetum purpureum*) e ração balanceada, além de sal mineralizado e água *ad libitum*.

A pesquisa foi desenvolvida na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV) Campus Viçosa e as análises foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia e no Núcleo de Microscopia e Microanálise do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, ambos pertencentes à Universidade Federal de Viçosa (UFV) Campus Viçosa.

Colheitas e avaliações seminais

As colheitas seminais foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu, SP, Brasil) aquecida a 42° C e manequim artificial, após estimulação dos machos com égua ou jumenta em cio. Após 5 coletas em dias alternados para esgota das reservas extragonadais foram iniciadas as coletas seminais experimentais. Imediatamente após a coleta, foi realizada a remoção da fração gelatinosa e sujidades utilizando o filtro de nylon. Durante toda a avaliação laboratorial o sêmen foi mantido sobre placa aquecedora a 37°C e durante o tempo de incubação os aparatos foram mantidos em caixa isotérmica fechada.

Cinética espermática

Para avaliação da cinética espermática as amostras seminais foram avaliadas quanto ao percentual de células com motilidade total, motilidade progressiva e vigor (0-5), mediante análise de um avaliador experiente em microscópio óptico de luz

(400x), utilizando-se 10 μ L da alíquota seminal em lâmina sob lamínula (24x32 mm) pré-aquecidas.

Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada mediante contagem dos espermatozoides em câmara hematocimétrica de Neubauer espelhada (PRECISION, CRLA[®], São Paulo/Brasil) em microscópio óptico (200x) a partir da diluição de uma alíquota do sêmen *in natura* em água, nas proporções de 1:20 e 1:50, para garanhão e jumento, respectivamente. O número de espermatozoides móveis na partida seminal foi calculado multiplicando a motilidade total pela concentração espermática.

Morfologia espermática

Para análise da morfologia espermática foram realizados esfregaços em lâminas de vidro para microscopia que posteriormente foram coradas com kit para coloração rápida (Panótico Rápido, Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda, Pinhais/PR, Brasil). As anormalidades espermáticas foram classificadas em defeitos maiores e menores a partir da contagem de 200 células quanto à morfologia de cabeça, peça intermediária, cauda, presença de gotas e formas múltiplas, resultando em uma porcentagem dos defeitos encontrados. Apenas os machos com valores de espermatozoides normais $\geq 70\%$ foram utilizados nos experimentos (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2013).

Integridade de membrana plasmática

Para análise de integridade de membrana plasmática (IMP) dos espermatozóides foi realizada a técnica de microscopia de epifluorescência (Olympus BX60), utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (PI). Previamente à realização das análises foram preparadas soluções de estoque (armazenadas a -20°C em frascos protegidos da luz) e soluções de trabalho (armazenadas a -5°C em *eppendorfs* protegidos da luz por no máximo 12h) (HARRISON e VICKERS, 1990). A descrição da preparação das soluções de estoque e trabalho estão dispostas em apêndice. No momento do teste, 10 μ L da solução de trabalho foi adicionada a 50 μ L de cada amostra espermática e após 10min de incubação procedeu-se com preparação das

lâminas/lamínulas para avaliação por microscopia. Nessa análise 200 células foram contadas, sendo os espermatozoides corados integralmente em verdes considerados íntegros e os espermatozoides corados em vermelho ou em verde e vermelho, considerados lesados (KARESKOSKI, REILAS, *et al.*, 2006) .

Viabilidade espermática

A proporção de espermatozoides corados e não corados foi realizada por citometria de fluxo utilizando iodeto de propídio (PI) (DENGLER, SCHULTE, *et al.*, 1995) em citômetro de fluxo BD FACSVersé TM® (Sunnyvale, CA, USA). O *software* BD FACSuite™ Application, do mesmo fabricante foi utilizado tanto para aquisição dos dados quanto para análise dos resultados.

Confecção dos aparatos contendo a MPOG

Para o teste de ligação à MPOG foram produzidos aparatos a partir de tubos *ependorf* com 2 ml de capacidade volumétrica. Utilizou-se um punch dermatológico descartável, com 4 mm de diâmetro (Kolplast, Itupeva, SP, Brasil), para realização da perfuração na lateral dos tubos, próximo à base, local em que posteriormente foi posicionado e fixado o fragmento da MPOG. Devido a delicadeza da membrana, os tubos que, após perfurados, não ficassem com a superfície totalmente lisa eram descartados.

Os fragmentos de MPOG foram obtidos de ovos não galados ovipostos no mesmo dia por galinhas oriundas da Unidade de Ensino Pesquisa e Extensão em Avicultura do DZO/UFV submetidas às mesmas condições ambientais e nutricionais. Inicialmente, a gema foi separada da clara, perfurada e lavada com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% sobre placa de Petri. Em seguida, a membrana foi aberta de forma a identificar a parte interna (superfície em contato com a gema) e a parte externa da membrana (superfície em contato com a clara).

Fragmentos de aproximadamente 1 cm² foram cortados com auxílio de bisturi e pinça histológica de ponta fina (Figura 1A). Cada aparato recebeu um fragmento de membrana cobrindo o furo de 4 mm de diâmetro (Figura 1B). Sistemáticamente, a face externa da membrana foi posicionada voltada para dentro do tubo, sendo esta então exposta aos espermatozoides nas etapas seguintes. Por fim, as membranas foram

fixadas aos tubos com auxílio de fita Parafilm® M (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, Barueri, SP, Brasil) e armazenadas em freezer -20° C até o uso (Figura 1C).

Previamente à inseminação dos aparatos com as amostras seminais de interesse, estes foram descongelados em estufa à 38°C preenchidos com diluente à base de leite desnatado (BotuSêmen®, Botupharma Ltda, Botucatu, SP, Brasil), para proteção térmica e manutenção da osmolaridade, por 30 minutos.

Figura 1. Confeção dos aparatos contendo a membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG). (A) Secção de fragmento com aproximadamente cm²; (B) Posicionamento do fragmento sobre a perfuração do aparato; (C) Fixação do fragmento aos aparatos com fita Parafilm® M.



Delineamento Experimental

Experimento I

A primeira parte do estudo correspondeu à validação do teste de ligação à MPOG, a qual foram avaliadas cinco porcentagens crescentes de viabilidade espermática (VE) do ejaculado de equídeos: 0%, 25%, 50%, 75% e 100%. Adicionalmente, foram testadas duas doses inseminantes (DIs): 10×10^6 (DI10) *versus* 50×10^6 (DI50) de espermatozoides totais por aparato. Para tal, dois ejaculados foram coletados de cada um dos dois animais férteis e hígidos selecionados, sendo um garanhão da raça Mangalarga Marchador e um jumento da raça Pêga.

O sêmen de cada animal foi dividido em duas partes: a primeira com 100% de VE, correspondendo à viabilidade máxima encontrada no ejaculado de um animal hígido; e a segunda com 0% de VE, caracterizada pela totalidade de espermatozoides imóveis após choque frio. Para obter amostra com 0% de VE, foram colocados 4 ml do sêmen *in natura* em tubo Falcon e, após vedado, o tubo foi imerso inicialmente em nitrogênio líquido (até completo congelamento) e posteriormente em banho maria à 37°C (até completo descongelamento) em dois ciclos. Para confirmação da morte de

todas as células, uma alíquota foi avaliada em microscópio óptico de luz (400x), verificando-se que todos os espermatozoides se apresentavam imóveis.

As partes com 0% e 100% de VE foram, então, diluídas sucessivamente nas proporções de 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100 (v/v) correspondendo, respectivamente, a amostras seminais com aproximadamente 0%, 25%, 50%, 75% e 100% de células viáveis. Cada nova diluição foi avaliada quanto à viabilidade espermática por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI).

A comparação entre a viabilidade espermática esperada e a proporção de espermatozoides vivos obtidos após a realização das cinco diluições seriadas (v/v) está demonstrada na Tabela 1 para as duas espécies.

Tabela 1. Proporção de espermatozoides vivos obtida em cada amostra seminal após diluições seriadas em cinco porcentagens de viabilidade espermática (0, 25, 50, 75 e 100%) determinadas por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente iodeto de propídio (PI).

Espécie	VE esperada (%)				
	0	25	50	75	100
Equina	2,34	19,2	32,3	54,4	90,6
Asinina	2,21	28,9	38,1	48,6	80,3

VE = viabilidade espermática

Para a realização do teste de ligação à MPOG com a primeira dose inseminante (DI10), os aparatos previamente descongelados em estufa seca à 37°C por 30 min como descrito anteriormente, foram inseminados com as 5 proporções de VE diluídas em diluente à base de leite desnatado (Botusêmen®, Botupharma, Botucatu/SP, Brasil), totalizando 10×10^6 espermatozoides em um volume final de 1,5 mL por aparato. Esse era o volume necessário para cobrir integralmente o local de fixação da MPOG na parede do *ependorf*. O teste foi realizado em duplicata, utilizando-se dois aparatos sob mesmas condições.

Após 1,5h de incubação, os aparatos foram acrescidos de 40 µL da solução de trabalho preparada, segundo metodologia descrita por Harrison e Vickers (1990), a partir da associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI) por 30min. Em seguida, adicionou-se 25 µL do

corante eosina-nigrosina por 5min para definição da área da MPOG que ficou exposta aos espermatozoides. Os aparatos foram então lavados com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% em 5 banhos. A membrana foi transferida delicadamente para uma lâmina e coberta com lamínula, utilizando-se pinça histológica para garantir que a membrana ficasse o mais esticada possível a fim de evitar que dobras prejudicassem a avaliação.

Sob microscópio de epifluorescência (Olympus BX-60®, Tóquio, Japão) em aumento de 400x foi realizada a aquisição de imagens de 10 campos com melhor resolução, escolhidos aleatoriamente, para posterior definição de todos os espermatozoides ligados de forma semiautomática, com o auxílio do software CountThins (Dynamic Ventures, Inc., Cupertino, CA, USA). A média do número de espermatozoides ligados por campo da MPOG (NEL/C MPOG) foi calculada para posterior análise estatística. Cada campo avaliado apresentava 0,00237 mm² de diâmetro mensurado por lâmina micrométrica.

Para a realização do teste de ligação à MPOG com a segunda dose inseminante (DI50) foi realizada uma nova coleta seminal de cada animal. Seguiu-se a mesma metodologia da primeira quanto ao processamento e diluições, entretanto, os aparatos foram inseminados com as 5 proporções de VE diluídas em diluente à base de leite desnatado (Botusêmen®, Botupharma, Botucatu/SP, Brasil), totalizando 50x10⁶ espermatozoides por aparato em 2 repetições.

Experimento II

Na segunda parte do estudo, foi avaliada a influência da adição do plasma seminal na capacidade de ligação dos espermatozoides à MPOG de amostras seminais frescas e descongeladas. Foram utilizados 3 garanhões (2 da raça Mangalarga Marchador e 1 da raça Bretã) e 3 jumentos (Pêga). Foram coletados 2 ejaculados de cada animal em dias alternados; destes, um ejaculado de cada animal foi utilizado para a preparação do *pool* de PS de cada espécie e o outro ejaculado foi utilizado para os testes de ligação à MPOG.

Para preparação do *pool* de plasma seminal os ejaculados dos três jumentos e três garanhões selecionados foram coletados conforme descrito anteriormente. Logo após a coleta, o ejaculado foi centrifugado em centrífuga convencional à 1000 x g por 30 minutos, o *pellet* foi descartado e o sobrenadante foi novamente centrifugado à 1000 x g, por 30 minutos. O novo *pellet* foi descartado e o sobrenadante filtrado em

filtro de malha de 0,22 μm (Millex[®], Millipore Indústria e Comércio LTDA, Brasil). A ausência de espermatozoides foi confirmada via microscopia óptica de luz (400 x). Após ser realizado o procedimento todos os animais, foi produzido um *pool* de plasma seminal dos asininos e outro *pool* de plasma seminal dos equinos, de forma a evitar o efeito individual do PS nas amostras seminais de interesse. Finalmente, o *pool* de cada espécie foi alíquotado em tubos criogênicos contendo 2 mL cada, identificados e armazenados em freezer -20° C até o uso. Previamente ao uso, um tubo contendo o *pool* de plasma seminal da espécie de interesse foi descongelado em temperatura ambiente (25°C), longe de fontes de luz e calor a fim de evitar alterações nas proteínas presentes no plasma seminal.

Um ejaculado de cada animal foi dividido em duas partes, sendo a primeira destinada aos testes com sêmen fresco e a segunda destinada aos testes com sêmen descongelado. Ambas foram diluídas em meio diluente a base de leite desnatado (Botusêmen[®], Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil) na proporção de 1:1 (v/v) e centrifugadas à 600 x g por 10 minutos, para formação do *pellet* de espermatozoides e descarte do plasma seminal. Para a alíquota mantida fresca, o *pellet* foi ressuscitado com diluente à base de leite desnatado na concentração de 10×10^6 sptzs/mL. Já para a alíquota a ser congelada, o *pellet* foi ressuscitado com diluente à base de gema de ovo (BotuCrio[®], Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) na concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL.

Após o envase em palhetas francesas de 0,5 mL, previamente identificadas, as mesmas foram lacradas com álcool polivinílico e levadas à geladeira de temperatura controlada (Minitub[®], Porto Alegre, RS, Brasil) permanecendo à 5°C por 20 minutos. Após esse tempo, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica de isopor com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido (N₂) até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas foram dispostas horizontalmente em um suporte a 6 cm do nível do N₂ por 20 minutos e após este período foram imersas no N₂ e transferidas em racks de alumínio para botijões criogênicos até o momento de utilização (PAPA, MELO, *et al.*, 2008), quando, então, foram imersas em banho-Maria a 37 °C por 1 minuto para completo descongelamento.

A partir da obtenção e processamento de amostras seminais frescas e descongeladas, foram estabelecidos quatro grupos a serem avaliados quanto à capacidade espermática de ligação à MPOG:

- Sêmen fresco sem plasma seminal (SFSPS) - aparatos inseminados com 1 mL do sêmen fresco centrifugado, posteriormente diluído à 10×10^6 sptzs/mL em Botusêmen[®], acrescido de mais 0,5 mL de Botusêmen[®].
- Sêmen fresco com plasma seminal (SFCPS) - aparatos inseminados com 1 mL do sêmen fresco centrifugado, posteriormente diluído à 10×10^6 sptzs/mL em Botusêmen[®], acrescido de 0,15 mL de PS + 0,35 mL de Botusêmen[®] (10% de PS, v/v).
- Sêmen descongelado sem plasma seminal (SDSPS) - aparatos inseminados com o sêmen descongelado, posteriormente diluído à 10×10^6 sptzs/mL em Botucurio[®], totalizando 1,5 mL.
- Sêmen descongelado com plasma seminal (SDCPS) - aparatos inseminados com o sêmen descongelado, posteriormente diluído à 10×10^6 sptzs/mL em Botucurio[®], totalizando 1,35 mL + 0,15 mL de (10% de PS, v/v).

Foi utilizada a DI de 10×10^6 espermatozoides totais por aparato, o volume final de 1,5mL foi estabelecido assim como no experimento 1 e os testes de ligação à MPOG foram realizados em duplicata.

Análise estatística

O pressuposto de normalidade foi avaliado utilizando o teste de Shapiro Wilk. Os dados das variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo. A comparação entre VEs e espécies para a variável NEL/C MPOG foi realizada utilizando uma análise de inferência para modelos mistos lineares generalizados (GLMMs) (Proc Glimmix). As matrizes de covariância foram escolhidas a partir dos critérios de informação de AIC (*Akaike's Information Criterion*), AICC (*Consistent Akaike's Information Criterion*) e BIC (*Bayesian Information Criterion*). Para cada experimento os efeitos fixos foram considerados como segue:

- **Experimento I:**
 - ✓ Modelo 1: viabilidade (VE);
 - ✓ Modelo 2: viabilidade (VE), espécie (ESP) e a interação viabilidade x espécie;
 - ✓ Modelo 3: viabilidade (VE), espécie (ESP), dose inseminante (DI) e a interação viabilidade x espécie x dose.

- **Experimento II:**

- ✓ Modelo 1: espécie (ESP), sêmen (Sem), plasma seminal (PS) e a interação espécie x sêmen x plasma seminal;
- ✓ Modelo 2: plasma seminal (PS).

A comparação das médias foi realizada com o comando PDIFF e com ajuste post-hoc de *Tukey*. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferença estatística foi considerada quando $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o SAS Studio.

RESULTADOS

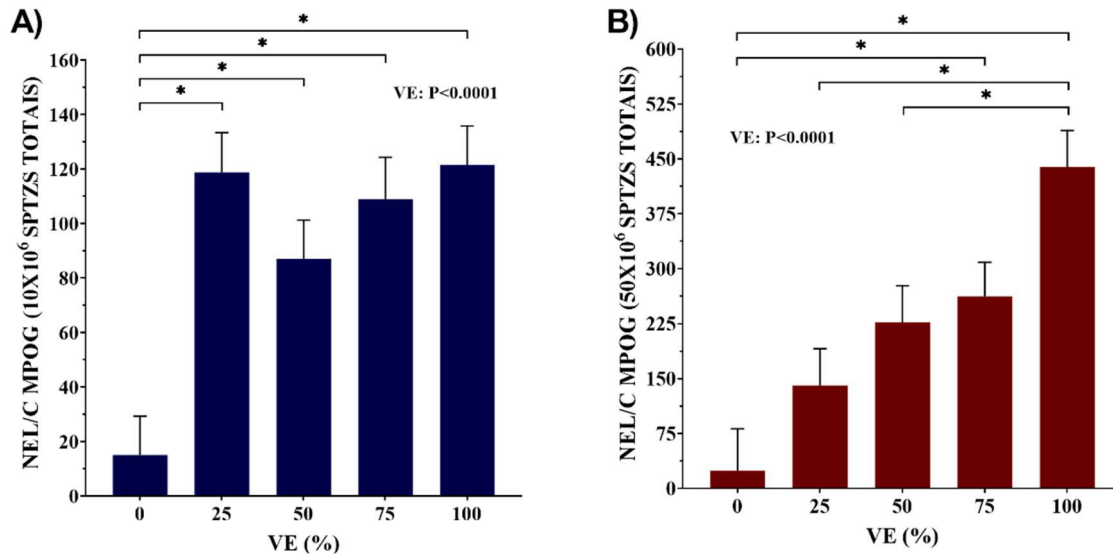
Experimento I

Comparação do NEL/C MPOG entre as diferentes viabilidades espermáticas

Quando o efeito da espécie foi desconsiderado, houve efeito da VE na NEL/C MPOG para as duas doses inseminantes testadas ($p < 0.0001$). A NEL/C MPOG foi menor ($p < 0.05$) nas amostras com VE0 (15 ± 14.2) quando comparada com a VE25 (118.7 ± 14.6), VE50 (87 ± 14.3), VE75 (108.8 ± 15.5) e VE100 (121.5 ± 14.3), utilizando a DI10 (Figura 1A). Entretanto, com a menor DI não ocorreu diferença na NEL/C MPOG entre amostras com 25, 50, 75 ou 100% de VE. Já com a DI50 (Figura 1B), a NEL/C MPOG foi menor ($p < 0.05$) na amostra VE0 (24.1 ± 57.2) em comparação a VE75 (262.3 ± 46.7) e VE100 (438.9 ± 50.2); além disso, utilizando esta maior dose inseminante também foi observada menor NEL/C MPOG ($p < 0.05$) nas amostras VE25 (140.6 ± 50.2) e VE50 (226.8 ± 50.2) em comparação a VE100 (438.9 ± 50.2).

Figura 2. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides equídeos ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco

porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) com doses inseminantes de 10×10^6 sptzs totais (A) e 50×10^6 sptzs totais (B) avaliadas.



*Indica diferença estatística entre as VEs ($p < 0.05$).

Comparação da NEL/C MPOG entre as diferentes doses inseminantes

Ainda sem considerar o efeito da espécie, houve efeito da DI ($p < 0.0001$) e da interação VE*DI ($p < 0.0001$) no NEL/C MPOG. A partir de 50% de viabilidade espermática, o NEL/C MPOG foi maior ($p < 0.05$) na DI de 50×10^6 sptzs totais em relação a DI de 10×10^6 sptzs totais (Tabela 2).

Tabela 2. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides equídeos ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) para duas doses inseminantes (DI 10×10^6 sptzs totais versus DI 50×10^6 sptzs totais).

DI	Viabilidade Espermática (%)				
	0	25	50	75	100
10×10^6 sptzs/ml	15 ± 19.6	140 ± 19.6	87 ± 19.6 ^b	109 ± 21.2 ^b	122 ± 19.6 ^b
50×10^6 sptzs/ml	24 ± 39.1	141 ± 34.3	227 ± 34.3 ^a	262 ± 31.9 ^a	439 ± 34.3 ^a

^{a-b} Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Comparação da NEL/C MPOG entre as espécies utilizando DI de 10×10^6 espermatozoides totais

Houve efeito da VE ($p=0.016$), da espécie ($p=0.0283$) e da interação VE*ESPÉCIE ($p=0.0327$). Para a espécie asinina, a NEL/C MPOG foi maior ($p<0.05$) na VE75 ($215,1\pm 22$) em relação a VE0 ($27,2\pm 18.4$). Adicionalmente, também na espécie asinina foi observada tendência de menor NEL/C MPOG ($p=0.0749$) na VE50 ($74,3\pm 18.4$) em relação a VE75 ($215,2\pm 22$). Para a espécie equina não foram observadas diferenças entre as VEs avaliadas na DI10. Comparando as duas espécies, os equinos apresentaram menor ($p=0.0322$) NEL/C MPOG na VE75 ($34,5\pm 18.4$) em relação aos asininos (215 ± 22).

Tabela 3. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) para machos da espécie equina e asinina com dose inseminante (DI) de 10×10^6 sptzs totais.

Espécie	Viabilidade Espermática (%)				
	0	25	50	75	100
Equina	3 ± 18.4	114 ± 18.4	100 ± 18.4	34 ± 18.4^b	115 ± 18.4
Asinina	27 ± 18.4^B	123 ± 19.4	$74 \pm 18.4^+$	$215 \pm 22^{Aa+}$	128 ± 18.4

^{a-b} Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística ($p<0.05$).

^{A-B} Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística ($p<0.05$).

⁺ Indica que houve tendência ($0.1 < p < 0.05$).

Comparação da NEL/C MPOG entre espécies utilizando DI de 50×10^6 espermatozoides totais

Foi observado efeito apenas da VE ($p<0.001$). O NEL/C MPOG foi maior ($p=0.0209$) para a VE100 (435 ± 70.9) em relação a VE0 (9 ± 93.8) na espécie equina. Já na espécie asinina, o NEL/C MPOG foi maior ($p<0.05$) para a VE100 (443 ± 76.6) em relação a VE0 (34 ± 76.6) e a V25 (106 ± 66.4).

Tabela 4. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) em cinco porcentagens de viabilidade espermática (VE0, VE25, VE50, VE75 e VE100) para machos da espécie equina e asinina com dose inseminante (DI) de 50×10^6 de espermatozoides totais.

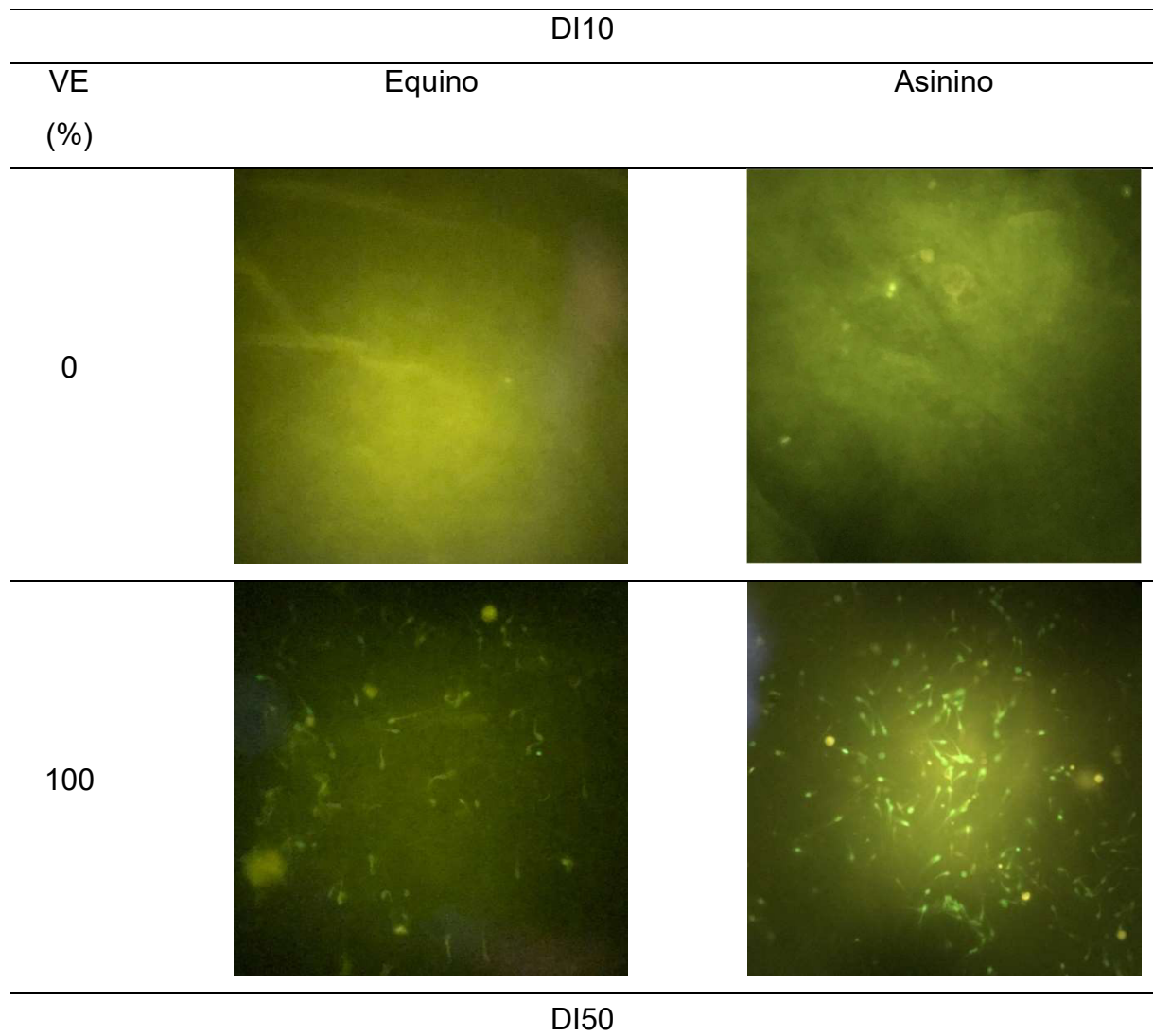
Espécie	VE (%)				
	0	25	50	75	100
Equina	9 ± 93.8^B	195 ± 83.9	241 ± 70.9	267 ± 66.4	435 ± 70.9^A

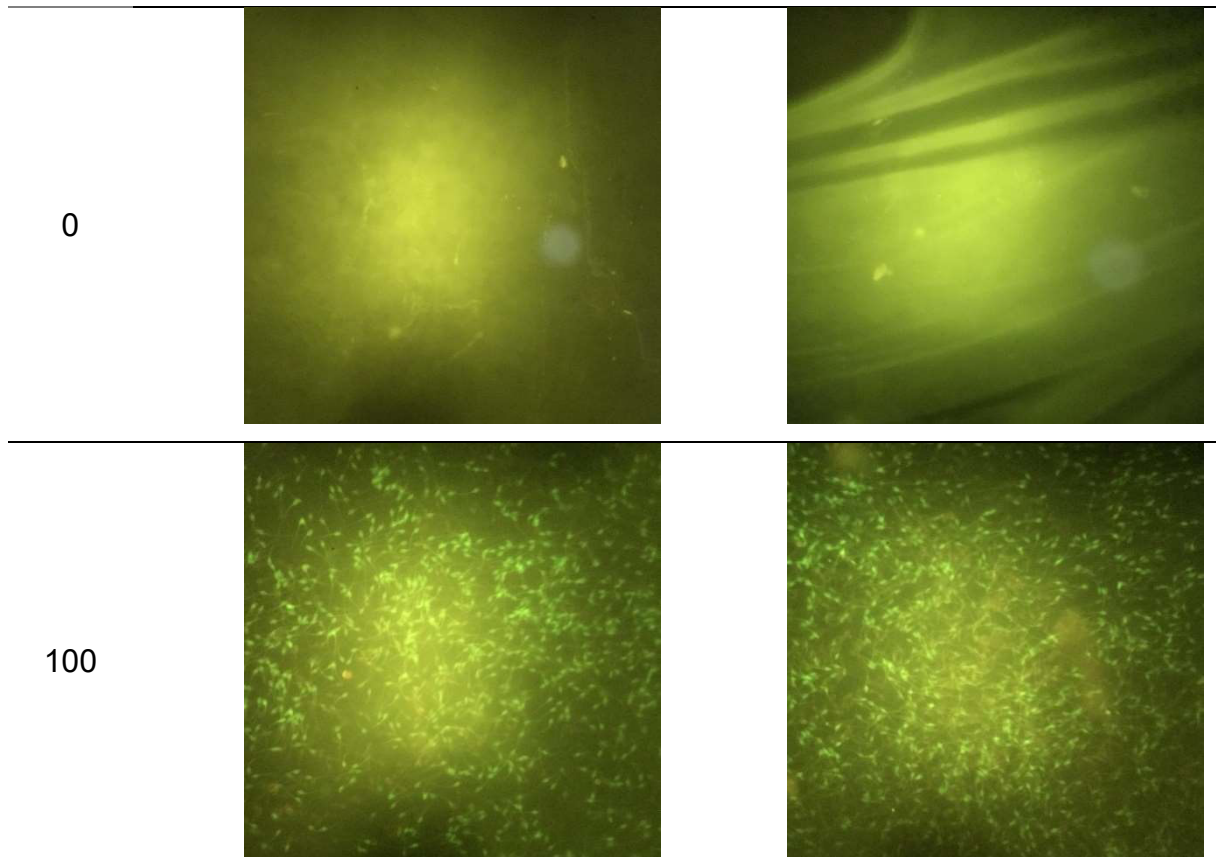
Asinina	34 ± 76.6^B	106 ± 66.4^B	210 ± 76.6	256 ± 70.9	443 ± 76.6^A
---------	-----------------	------------------	----------------	----------------	------------------

^{A-B} Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Quando o efeito da espécie foi considerado, diferenças foram encontradas ($p < 0,05$) no número de espermatozoides de equinos e asininos ligados à MPOG com viabilidades espermáticas de 0 e 100% para a DI50, mas não houve diferença para a DI10 (Figura 3).

Figura 3. Imagens representativas de microscopia de epifluorescência (aumento 400x) das lâminas de MPOG após incubação dos espermatozoides e coloração com iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), para as espécies equina e asinina, com viabilidade espermática (VE) de 0 e 100% em dose inseminante de 10×10^6 espermatozoides totais (DI10) e de 50×10^6 espermatozoides totais (DI50).



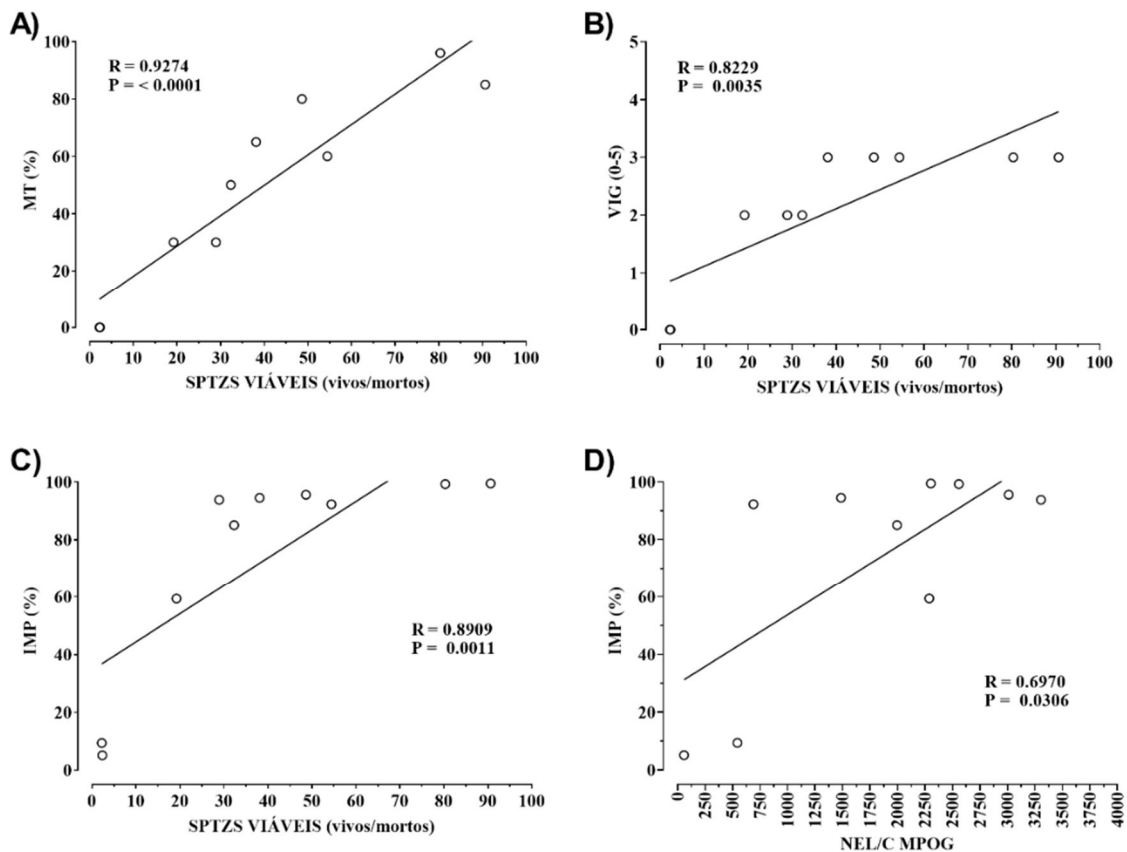


MPOG = membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha; VE = viabilidade espermática; PI = iodeto de propídio; CFDA = diacetato de carboxifluoresceína; DI50 = dose inseminante de 10×10^6 sptzs totais/aparato e de 50×10^6 sptzs totais/aparato.

Correlações entre a NEL/C MPOG e parâmetros espermáticos

Como mostrado na Figura 4A, B e C, dentre os parâmetros espermáticos avaliados, observou-se uma correlação forte e positiva entre o número de espermatozoides viáveis e a MT, VIG e IMP ($p \leq 0.0035$; $r = 0.9274$, 0.8229 e 0.8909 , respectivamente). Adicionalmente, observou-se uma correlação moderada e positiva entre IMP *versus* a NEL/C MPOG ($p = 0.0306$; $r = 0.6970$) (Figura 4D).

Figura 4. Correlações (A-C) entre o número de espermatozoides viáveis (proporção vivos/mortos) e a motilidade total (MT), vigor (VIG) e integridade de membrana plasmática (IMP). Correlação entre análise de integridade de membrana plasmática (IMP) e média do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) (D).



Experimento II

Comparação da NEL/C MPOG entre os tipos de sêmen (fresco e congelado) e espécies

Foi observado efeito do tipo de sêmen ($p < 0.0001$) e da espécie ($p = 0.0015$). Tanto na espécie equina ($p = 0.0185$) quanto na asinina ($p = 0.0390$) a NEL/C MPOG foi maior para o sêmen congelado (96 ± 7.82 ; 73 ± 6.5) em comparação ao sêmen fresco (68 ± 5.5 ; 49 ± 6.25).

Tabela 5. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) determinados pelo tipo de sêmen (fresco ou congelado).

Espécie	Tipo de Sêmen	
	Fresco	Congelado
Equina	68 ± 5.5^B	96 ± 7.82^A
Asinina	49 ± 6.25^B	73 ± 6.5^A

^{A-B} Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Comparação da NEL/C MPOG entre o tipo de sêmen (fresco e congelado) e a adição de plasma seminal

Houve efeito apenas do tipo de sêmen ($p=0.0005$). O sêmen congelado com adição de plasma seminal apresentou maior ($p=0.0013$) NEL/C MPOG quando comparado ao sêmen fresco com adição de plasma seminal.

Tabela 6. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) determinados pelo tipo de sêmen (fresco ou congelado) e pela adição (CPS) ou não (SPS) de plasma seminal.

Plasma seminal	Tipo de sêmen	
	Fresco	Congelado
Com plasma	50 \pm 5.92 ^B	84 \pm 7.00 ^A
Sem plasma	68 \pm 5.88	80 \pm 7.23

^{A-B} Letras diferentes entre as linhas indicam diferença estatística ($p<0.05$)

Comparação entre espécies a partir da adição de plasma seminal e tipos de sêmen (fresco e congelado)

Houve efeito da espécie ($p=0.0013$), do tipo de sêmen ($p<0.0001$), interação sêmen*PS ($p=0.0407$) e entre espécie*sêmen*PS ($p=0.0038$). A NEL/C MPOG no grupo sêmen congelado com adição de plasma seminal foi maior para equinos em relação a asininos ($p=0.0181$).

Tabela 7. Média (\pm EPM) do número de espermatozoides ligados por campo da membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (NEL/C MPOG) determinados pelo tipo de sêmen (fresco ou congelado) e pela adição (CPS) e ou não (SPS) de plasma seminal.

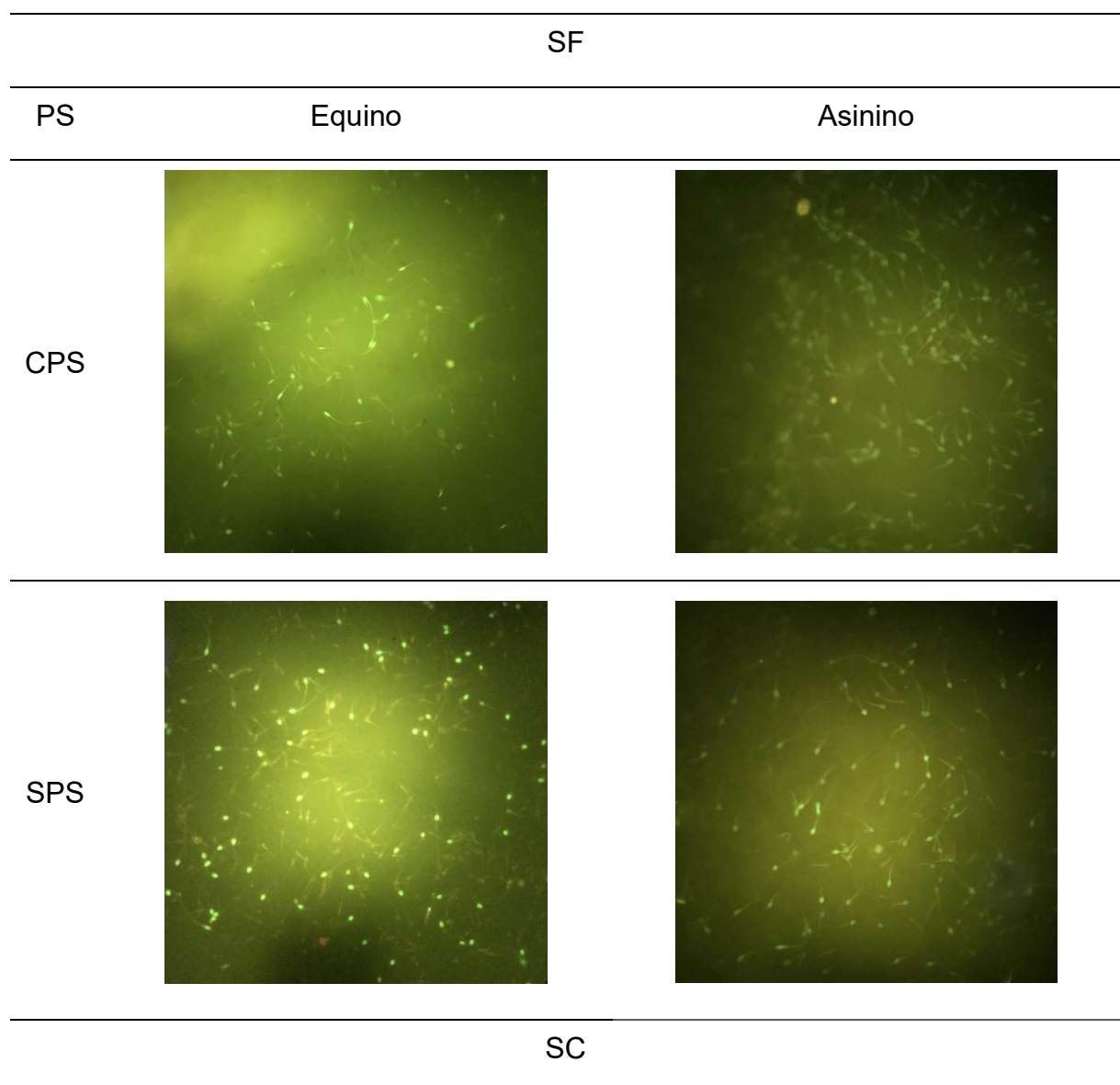
Espécie	Sêmen Fresco		Sêmen Congelado	
	CPS	SPS	CPS	SPS
Equina	53 \pm 7.79	83 \pm 7.74	114 \pm 11.25 ^a	80 \pm 10.67
Asinina	47 \pm 8,78	51 \pm 8.71	66 \pm 8.71 ^b	81 \pm 7.74

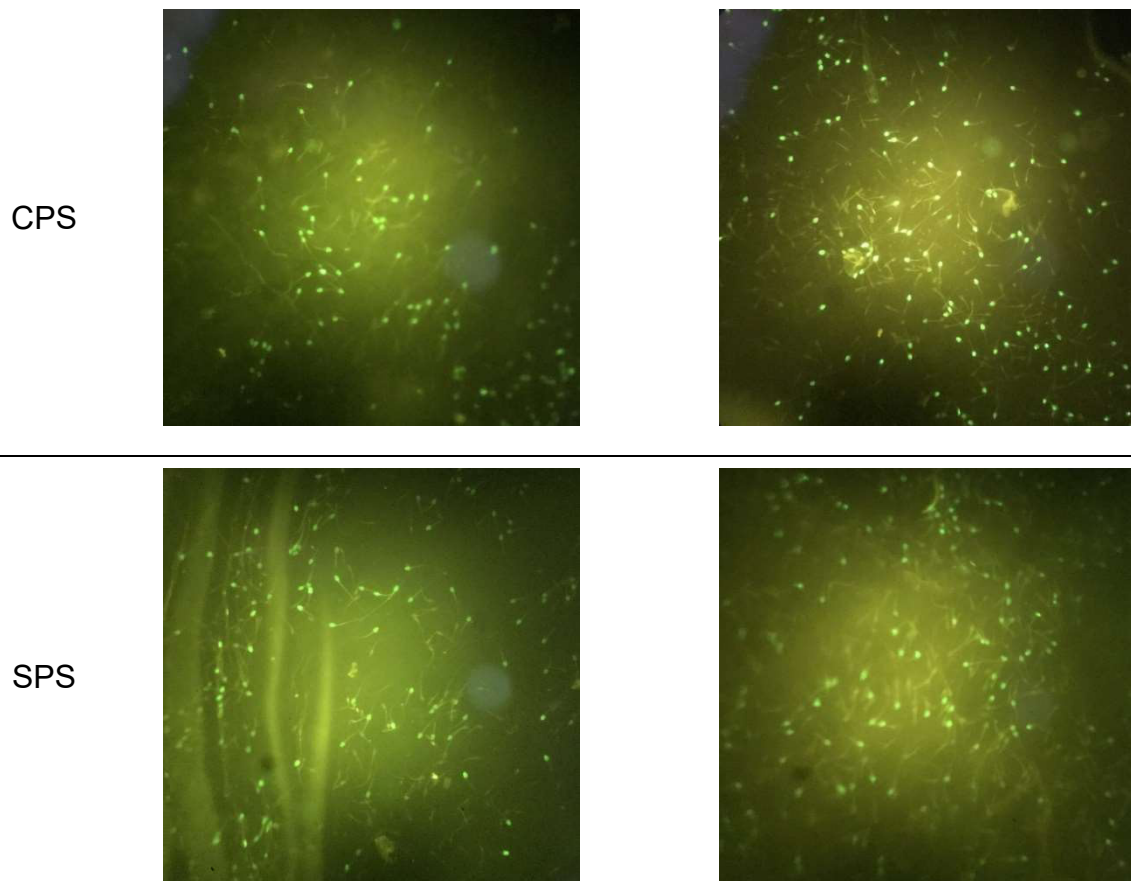
^{a-b} Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística ($p<0.05$).

Diferenças foram encontradas no número de espermatozoides de equinos e asininos ligados à MPOG utilizando sêmen fresco e congelado. Além disso, a adição

de plasma seminal aumentou o potencial de ligação do sêmen congelado equino comparado ao asinino (Figura 5).

Figura 5. Imagens representativas de microscopia de epifluorescência (aumento 400x) das lâminas de membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha (MPOG) após incubação dos espermatozoides e coloração com as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) para as espécies equina e asinina com dose inseminante de 10 milhões de espermatozoides totais (DI10) para os tratamentos sêmen fresco com adição de plasma seminal (SFCPS), sêmen fresco sem adição de plasma seminal (SFSPS), sêmen congelado com adição de plasma seminal (SCCPS) e sêmen congelado sem adição de plasma seminal (SDSPS).





MPOG = membrana perivitelínica da gema do ovo de galinha; PI = iodeto de propídio; CFDA = diacetato de carboxifluoresceína; DI10 = dose inseminante de 10×10^6 espermatozoides totais por aparato; SF = sêmen fresco; SD = sêmen descongelado; PS = plasma seminal; CPS = com plasma seminal; SPS = sem plasma seminal.

DISCUSSÃO

O presente trabalho investigou o uso do teste de ligação à MPOG para diferenciação de amostras seminais tanto de equinos quanto de asininos em diferentes viabilidades espermáticas. Esse teste é uma alternativa mais rápida e econômica em relação a outros que avaliam o potencial de ligação *in vitro* do ponto de vista funcional dos espermatozoides. Além disso, protocolos de congelamento seminal preconizam a remoção do plasma seminal; assim, neste estudo buscamos avaliar o efeito da sua adição após descongelamento na capacidade fertilizante do sêmen, uma vez os resultados ainda são contraditórios quanto aos seus benefícios e/ou malefícios para a fertilidade.

Foi utilizada a associação entre as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), que identificam espermatozoides com

membrana plasmática lesada e espermatozoides com membrana plasmática íntegra, respectivamente. No presente estudo, tanto os espermatozoides corados em vermelho quanto os corados em verde, ligados à MPOG, foram contados, visto que, após a ligação do espermatozoide à membrana oocitária ocorre a reação acrossomal, resultando na lise da membrana plasmática e acrossomal espermática, permitindo a entrada do corante PI. Dessa forma justifica-se a contagem dos espermatozoides corados em verde, vermelho e pelas duas cores (membrana semi-lesada).

Os resultados deste estudo demonstraram que espermatozoides de equinos e asininos são capazes de se ligar à MPOG, possibilitando a utilização do presente teste para equídeos. O teste de ligação espermática à MPOG, assim como o de ligação à hemizona homóloga (FAZELI, STEENWEG, *et al.*, 1995) e os de ligação à ZP homóloga ou heteróloga (MEYERS, LIU, *et al.*, 1996; AL-ESSAWE, WALLGREN, *et al.*, 2018) objetivam avaliar o espermatozoide do ponto de vista funcional, como forma de prever *in vitro* se a etapa de fertilização tem potencial *in vivo*. Entretanto, a obtenção de oócitos é laboriosa e onerosa (COLENBRANDER, GADELLA e STOUT, 2003; AL-ESSAWE, WALLGREN, *et al.*, 2018). Quando os oócitos são oriundos de ovários de abatedouros não se tem registros precisos do status reprodutivo das fêmeas, já quando são obtidos por aspiração folicular após protocolos de superovulação em fêmeas vivas, o procedimento é considerado invasivo e a recuperação oocitária é menos eficiente nas éguas quando comparado a de outras fêmeas domésticas (ALVARENGA, MCCUE, *et al.*, 2001). Portanto, algumas das vantagens do uso do teste de ligação à MPOG são o baixo custo, fácil acesso e eliminação da variabilidade natural entre fêmeas, uma vez que, com uma única MPOG é possível produzir 20 ou mais aparatos para realização do teste em mais de um indivíduo ou tratamentos.

Diferente de outras metodologias, em que o fragmento de MPOG é posicionado no fundo de um recipiente (SANTOS, 2010; CSERMAK JUNIOR, 2011; CORCINI, DA SILVA, *et al.*, 2012; GARAY, 2012; PINHO, SHIOMI, *et al.*, 2012; BRITO, LOSANO, *et al.*, 2017), neste trabalho adaptou-se o aparato proposto em trabalho com cães, divergindo apenas quanto à forma de fixação da membrana ao eppendorff (PAULA, 2018). No presente estudo a MPOG foi fixada utilizando-se fita Parafilm com intuito de promover maior agilidade na produção dos aparatos e facilidade de armazenamento. Além disso, o posicionamento do fragmento de MPOG na lateral do eppendorf foi pensado de maneira a permitir exposição e contabilização padronizada, além de

impedir que espermatozoides mortos/lesados que, porventura, tenham decantado fossem confundidos com espermatozoides ligados.

Na literatura foram relatados alguns tipos de aparatos que foram aprimorados ao longo do tempo objetivando maior facilidade para sua produção bem como para extrair resultados de forma eficiente. No entanto, a descrição dos pontos críticos de produção desses aparatos e das dificuldades na visualização e contagem de espermatozoides ligados à MPOG não é descrita na maioria dos trabalhos prévios publicados. Quanto aos principais desafios da presente técnica, pode-se citar a manipulação da MPOG, por se tratar de uma membrana muito fina e delicada e a padronização dos aparatos, bem como da contagem de espermatozoides. Quanto maior a DI utilizada, mesmo com lentes de microscopia de maior aumento (400x), mais difícil é a visualização individualizada das células, devido à sobreposição de espermatozoides e à espessura da MPOG, que varia entre diferentes localidades da mesma. A utilização do método semiautomatizado, aplicado neste trabalho, poderia ser substituído pelo método automático, mediante utilização de softwares de contagem celular automática, que poderiam ser desenvolvidos para esta finalidade.

Experimento I

No experimento I, visando a validação do teste, comparou-se cinco porcentagens de VE (0, 25, 50, 75 e 100%) do sêmen de equídeos em duas DIs distintas. Quando a DI10 foi utilizada, foi possível diferenciar amostras inférteis (VE0) de amostras com potencial fértil (\geq VE25). Portanto, com a menor DI utilizada o teste se mostrou mais efetivo para predizer subfertilidade ao invés de fertilidade de equídeos, uma vez que, amostras com baixa viabilidade, independente de outras características de qualidade espermática, irão apresentar menor número de espermatozoides ligados, entretanto, o máximo potencial de fertilidade requer outros atributos além da capacidade de ligação (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998; CORCINI, DA SILVA, *et al.*, 2012; PINHO, SHIOMI, *et al.*, 2012).

Já utilizando DI50 foi possível identificar amostras seminais de equídeos com alto potencial de fertilidade (\geq 75%), entretanto, em um dos ensaios uma amostra com VE <75%, foi estatisticamente similar à VE0. A partir desses resultados, nota-se que resultados mais concisos e que possibilitam o ranqueamento entre amostras seminais de diferentes viabilidades podem ser alcançados com um maior número de repetições (aparatos contendo a MPOG) por amostra.

Além disso, quando as DIs foram comparadas se observou maior NEL/C MPOG para a DI de 50×10^6 sptzs totais em relação a DI de 10×10^6 sptzs totais a partir de 50% de viabilidade espermática, quando o efeito da espécie foi desconsiderado. Assim, é possível inferir que quanto maior o número de espermatozoides na amostra maior a probabilidade da ocorrência de ligações à MPOG. De maneira semelhante, o aumento da concentração espermática aumentou linearmente o número de espermatozoides de galos ligados à MPOG, ou seja, o teste apresenta resposta dose dependente crescente (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998). Já em humanos, a resposta é dose dependente decrescente, independente do potencial de ligação da célula espermática o aumento da concentração reduz a probabilidade de ligação, nesse caso, sugeriu-se que houve aumento na competição entre os espermatozoides (AMANN, SHABANOWITZ, *et al.*, 1999). Dessa forma, devido ao grande número de espermatozoides ligados e aglomerados por campo na DI50, a individualização de células espermáticas para contagem sob microscopia de epifluorescência foi dificultada, o que pode ter subestimado a contagem total. A menor DI utilizada no experimento II se justifica pela facilidade e maior acurácia na contagem do número total de espermatozoides por campo.

Ainda no experimento I, quando as espécies foram comparadas, foi observado maior NEL/C MPOG para os asininos em relação aos equinos nas amostras com 75% de VE, quando utilizada DI de 10×10^6 sptzs totais. Além disso, quando analisados individualmente é possível observar que os espermatozoides de cada animal apresentaram diferenças entre as VEs na ligação à MPOG entre as DIs utilizadas. Enquanto que para o garanhão não foi observada diferença estatística na NEL/C MPOG entre as VEs, para o jumento houve diferença entre VE0 e VE75, por exemplo. Essa diferença entre as duas espécies pode ser explicada devido a diferenças morfofuncionais encontradas entre seus espermatozoides. A cabeça dos espermatozoides asininos é menor e a peça intermediária é maior do que em equinos, sugerindo uma correlação entre a morfometria e motilidade, já que os espermatozoides de jumentos além de mais rápidos, apresentam maior movimento linear (MIRÓ, TABERNER, *et al.*, 2008).

Embora o aparato contendo a MPOG desenvolvido nesse estudo tenha buscado mimetizar o que aconteceria no processo de fertilização *in vivo*, em que é necessária motilidade total, progressiva e vigor para que seja possível tal ligação entre a célula espermática e o oócito no oviduto, não foi observada correlação entre a

cinética espermática e o NEL/C MPOG. Embora não tenha sido observado correlações fortes entre parâmetros de cinética espermática e o teste de ligação à MPOG, a IMP apresentou moderada correlação positiva com a NEL/C MPOG ($R=0.6970$). Esse resultado é justificável em testes *in vitro*, uma vez que as adversidades encontradas pelos espermatozoides no trajeto percorrido até o oviduto *in vivo*, estão ausentes e, portanto, parâmetros de motilidade e vigor, embora necessários, sejam secundários nos testes *in vitro*. Para que ocorra a fertilização, os espermatozoides precisam apresentar a membrana plasmática e acrossomal íntegras para que a ligação com a ZP seja possível, só então essa membrana será lisada durante a reação acrossomal. De forma semelhante, em cães, a redução na proporção de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegra coincidiu com a redução do número de espermatozoides ligados à MPOG (BRITO, LOSANO, *et al.*, 2017).

Experimento II

Neste segundo estudo, buscou-se avaliar o efeito da adição de plasma seminal ao sêmen fresco e descongelado sobre a capacidade de ligação dos espermatozoides à MPOG. Nossos resultados demonstram que o processo de criopreservação não influenciou negativamente na capacidade de ligação dos espermatozoides de equídeos à MPOG, uma vez que tanto para o sêmen fresco quanto para o sêmen descongelado foram observados espermatozoides ligados. Em outras espécies, foi demonstrado que a criopreservação reduziu a capacidade de ligação dos espermatozoides. Tanto em galos quanto em cães, foi observada redução no percentual de espermatozoides do sêmen descongelado ligados à MPOG em relação ao sêmen fresco, apesar de ligações serem possíveis em ambas as situações. Nos dois casos, essa diminuição foi atribuída aos danos celulares causados à célula espermática durante o processo de criopreservação (BARBATO, CRAMER e HAMMERSTEDT, 1998; VASCONCELOS, 2015).

Em oposição a estes resultados, no presente estudo a NEL/C MPOG foi maior para as amostras de sêmen descongelado em relação as amostras de sêmen fresco. Isso pode ter ocorrido devido ao processo de criocapacitação espermática que ocorre com o descongelamento, uma vez que o processo de criopreservação induz mudanças na célula espermática referentes ao acrossoma, integridade de membrana plasmática, níveis de colesterol e proteínas de membrana, semelhantes às que

ocorrem durante a capacitação (TALUKDAR, AHMED, *et al.*, 2017). Entretanto, mesmo que ocorram modificações semelhantes as fisiológicas, as células espermáticas criocapacitadas são menos estáveis, apresentam danos biofísicos e, portanto, tem menor durabilidade no trato reprodutor feminino (VADNAIS e ALTHOUSE, 2011). Fisiologicamente, quando o sêmen fresco é depositado no trato reprodutor feminino, a etapa de capacitação espermática é mais longa quando comparada à criocapacitação do sêmen criopreservado e até por isso apresenta mais chances de sucesso *in vivo*. O delineamento utilizado neste estudo, com tempo de incubação igual a 1,5h, pode ter oferecido uma vantagem aos espermatozoides do sêmen descongelado já criocapacitados em relação aos espermatozoides do sêmen fresco que requerem tempo maior para sofrerem capacitação.

Adicionalmente, o meio diluidor utilizado para a criopreservação, composto por 10% de gema de ovo, soluções tampão, açúcar, antioxidantes, gentamicina 500mg/L, glicerol 1% e formamida 4% (GOBATO, SEGABINAZZI, *et al.*, 2022), pode ter funcionado como uma fonte extra de energia para os espermatozoides dos grupos SDCPS e SDSPPS em detrimento aos dos grupos com sêmen fresco, favorecendo, assim, a ligação espermática. O meio diluidor utilizado para o sêmen fresco é à base de leite desnatado, e, apesar de também conter componentes energéticos, possui formulação distinta, o que pode ter levado à diferenças na capacidade de ligação espermática. Um estudo em caprinos não encontrou diferença entre as médias do teste de ligação com sêmen fresco ou descongelado. Foi sugerido que a técnica de congelamento utilizada não afetou as estruturas espermáticas responsáveis pela sua adesão à membrana (SANTOS, 2010).

O plasma seminal contém proteínas, hormônios, eletrólitos que atuam na ativação da motilidade espermática e na atividade miométrial para transporte espermático até o oviduto possibilitando a fertilização do oócito (ANDRADE, ZAFFALON, *et al.*, 2011). No presente trabalho não foi observado efeito da adição de plasma seminal sobre a capacidade de ligação espermática do sêmen fresco ou após o descongelamento à MPOG, assim como observado em estudos anteriores *in vivo* que demonstraram a capacidade fertilizante de espermatozoides coletados da cauda do epidídimo de garanhões, sem o prévio contato com o plasma seminal (MONTEIRO, 2010).

O efeito da adição de plasma seminal ao sêmen descongelado ainda é controverso na literatura. Por um lado, a adição de PS de garanhões com alta

motilidade pós descongelamento ao sêmen de garanhões com baixa motilidade pós descongelamento aumentou significativamente a integridade de membrana e motilidade progressiva deste último (AURICH, KUHNE, *et al.*, 1996), demonstrando o efeito da diferença na composição do PS entre garanhões. Além disso, foi verificada maior capacidade de ligação às células do oviduto de bovinos de espermatozoides do ejaculado que entraram em contato com o plasma seminal em relação a espermatozoides de diferentes porções do epidídimo de garanhões sem contato com o plasma seminal (CARNEIRO, MONTEIRO, *et al.*, 2017).

Adicionalmente, o acréscimo de 20% de PS após o descongelamento seminal, aumentou a porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal e plasmática íntegra simultaneamente em equinos (ANDRADE, ZAFFALON, *et al.*, 2011) e o acréscimo de 50% de PS também após o descongelamento de sêmen mas desta vez oriundo do epidídimo de equinos, além de não causar danos aos espermatozoides, aumentou as taxas de prenhez após IA (MIRÓ, MORATÓ, *et al.*, 2020).

Por outro lado, a adição de 5% de PS à amostra seminal após descongelamento diminuiu significativamente a capacidade de ligação de espermatozoides equinos à zona pelúcida heteróloga bovina, em relação a amostra seminal sem adição de PS. Essa redução foi ainda maior quando o tempo de exposição ao PS foi prolongado (mais de 18h) (AL-ESSAWE, WALLGREN, *et al.*, 2018).

Dessa forma, é importante ressaltar que o fluido das glândulas sexuais acessórias, além de muito complexo, não tem sua função restrita à fecundação. Diversos estudos concluíram que o PS é importante no trato reprodutor feminino atuando no transporte espermático, modulação da endometrite pós cobertura, proteção de espermatozoides viáveis e eliminação por fagocitose de espermatozoides não viáveis por neutrófilos (TROEDSSON, DESVOUSGES, *et al.*, 2005; VILÉS, RABANAL, *et al.*, 2013). Assim, outros estudos avaliando a adição de proteínas isoladas do PS ao sêmen, bem como a adição de PS proveniente de indivíduos com diferentes fertilidades em testes de ligação *in vitro*, são desejáveis.

Apesar do teste de ligação à MPOG se mostrar promissor na determinação do potencial fertilizante de amostras seminais para avaliação de indivíduos ou de tratamentos, por ser um teste laboratorial imediato e com custo reduzido em relação aos testes de fertilidade tradicionais, nossos resultados demonstraram limitações do

mesmo, por não diferenciar completamente a capacidade de ligação à MPOG de amostras seminais com diferentes níveis de viabilidades espermáticas. Assim, são necessários estudos adicionais que investiguem e promovam ajustes na dose inseminante, visando distinguir níveis de fertilidade de diferentes amostras seminais; no número de aparatos contendo a MPOG necessários por amostra seminal, visando aumentar a repetibilidade do teste; no tempo e na temperatura de incubação dos aparatos pós inseminação; e na padronização da manipulação da MPOG para preparação dos aparatos.

CONCLUSÃO

Existem diferenças na capacidade de ligação espermática à MPOG entre os machos equídeos, entre diferentes doses inseminantes e entre o sêmen fresco e congelado, sendo superior para os asininos, para maior dose inseminante e para o sêmen descongelado. No entanto, o plasma seminal não influencia o potencial de ligação de espermatozoides equídeos à MPOG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ESSAWE, E. M. et al. Seminal plasma influences the fertilizing potencial of cryoperved stallion sperm. **Theriogenology**, 115, 2018. 99-107.

ALVARENGA, M. A. et al. Ovarian superestimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, 56, 2001. 879-887.

AMANN , R. P. et al. In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. **Journal of Andrology**, 20, n. 5, 1999. 648-654.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopresevation and a review of cryopreservation of stallion apermatozoa. **Special Review**, 7, n. 3, 1987.

ANDRADE, A. F. C. et al. Additions of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, 46, 2011. 682-686.

ARAÚJO, G. R. **Uso de sondas fluorescentes e ensaio de ligação a ovócitos heterólogos e a membrana perivitelínica de ovo de galinha (Gallus gallus) para avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de jaguatirica (Leopardus pardalis)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 64. 2012.

AURICH, J. E. et al. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, 46, 1996. 791-797.

BARBATO, G. F.; CRAMER, P. G.; HAMMERSTEDT, R. H. A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. **Biology of Reproduction**, 58, 1998. 686-699.

BRITO, M. M. et al. Sperm-binding to the perivitelline membrane of chicken egg yolk as a functional test for sperm evaluation in dogs. **Brazilia Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 54, 2017. 366-374.

CARNEIRO, J. A. M. et al. Heterologous oviductal cells binding capacity of cryopreserved equine ejaculated and epididymal spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, 59, 2017. 40-48.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3^a. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, 38, 2003. 305-311.

CORCINI, C. D. et al. Concentração de lactato de cálcio e tempo de incubação sobre a capacidade de adesão e penetração de espermatozoides suínos na membrana perivitelina do ovo de galinha. **Ciência Rural**, 42, n. 1, 2012. 142-146.

CSERMAK JUNIOR, A. C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide do cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 83. 2011.

DENGLER, W. A. et al. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. **Anti-Cancer Drugs**, 6, 1995. 522-532.

FAZELI, A. R. et al. Relation between stallion sperm binding to homologous hemizonae and fertility. **Theriogenology**, 44, 1995. 751-760.

GARAY, R. M. **Uso de sondas fluorescentes para avaliação seminal de ejaculado de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) e ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) como ferramenta de predição de fertilidade espermática**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 57. 2012.

GOBATO, M. L. M. et al. Ability of donkey sperm to tolerate cooling: Effect of extender base and removal of seminal plasma on sperm parameters and fertility rates in mares. **Frontiers in Veterinary Science**, 9, 2022.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, 88, 1990. 343-352.

HENNEKE, D. R. et al. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine Veterinary Journal**, 15, n. 4, 1983. 371-372.

ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, 14, 2012. 816-821.

KARESKOSKI, A. M. et al. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, 41, 2006. 33-38.

LOVE, C. C. et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, 63, 2005. 1584-1591.

MANASKOVA, P. et al. Mutual interactions of boar seminal plasma proteins studied by immunological and chromatographic methods. **American Journal of Reproductive Immunology**, 50, 2003. 399-410.

MEYERS, S. A. et al. Zona pellucida binding and zona-induced acrosome reactions in horse spermatozoa: comparisons between fertile and subfertile stallions. **Theriogenology**, 46, 1996. 1277-1288.

MIRÓ, J. et al. **Morphometry and motility of donkeys spermatozoa vs horse spermatozoa**. 1st International Meeting AERA-BAS. [S.l.]: [s.n.]. 2008. p. 75.

MIRÓ, J. et al. Preservation of epididymal stallion sperm in liquid and frozen states: effects of seminal plasma on sperm function and fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, 88, 2020. 102940.

MONTEIRO, G. A. **Criopreservação e fertilidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões**. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, p. 81. 2010.

NEUHAUSER, S.; GOSELE, P.; HANDLER, J. Postthaw addition of autologous seminal plasma improves sperm motion characteristics in fair and poor freezer stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, 72, 2019. 117-123.

OKAMURA, F.; NISHIYAMA, H. The passage of spermatozoa through the vitelline membrane in the domestic fowl, *Gallus gallus*. **Cell and Tissue Research**, 188, 1978. 497-508.

PAPA, F. O. et al. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, 107, 2008. 293-301.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, 38, 1992. 209-222.

PAULA, T. A. R. **Desenvolvimento da técnica de seleção de espermatozoides viáveis por centrifugação em camada única de coloide, em cão doméstico como modelo experimental para carnívoros silvestres**. Ulisboa. Lisboa, p. 41. 2018.

PIMENTEL, C. A. **Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. [S.l.]: [s.n.]. 1989. p. 127-132.

PINHO, R. O. et al. Teste de ligação de espermatozoides de suínos da raça Piau à membrana perivitelina da gema do ovo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 36, n. 4, 2012. 245-249.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C.; CRABO, B. G. Relation between fertility of fresh and frozen stallion semen and its quality measured as sperm motility with glass wool/Sefadex filters. **Journal of Reproduction and Fertility**, 44 (suppl.), 1991. 107-114.

SANTOS, M. C. R. **Métodos alternativos para análises da capacidade de ligação dos espermatozoides caprinos**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 54. 2010.

TALUKDAR, D. J. et al. Cryopreservation induces capacitation-like changes of the swamp buffalo spermatozoa. **Buffalo Bulletin**, 36, n. 1, 2017. 221-229.

TOPFER-PETERSEN, E. et al. The role of stallion seminal proteins in fertilisation. **Animal Reproduction Science**, 89, 2005. 159-170.

TROEDSSON, M. H. T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, 89, 2005. 171-186.

VADNAIS, M. L.; ALTHOUSE, G. C. Characterization of capacitation, crioinjury, and the role of seminal plasma in porcine sperm. **Theriogenology**, 76, 2011. 1508-1516.

VASCONCELOS, G. D. S. C. **Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação à membrana perivitelina de ovo de galinha (*Gallus gallus*) para avaliação de espermatozoides frescos e descongelados de cão (*Canis lupus familiares*)**. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, p. 60. 2015.

VILÉS, K. et al. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen.

Animal Reproduction Science, 143, 2013. 57-63.

WACLAWEK, M. et al. The chicken homologue of zona pellucida protein-3 is synthesized by granulosa cells. **Biology of Reproduction**, 59, 1998. 1230-1239.

APÊNDICE

Preparo das sondas fluorescentes

Soluções	Constituintes	Quantidade
Estoque PI	Iodeto de Propídio ¹	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mg
Estoque CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína ²	9.2 mg
	DMSO	20 ml
Estoque de Formaldeído	Formalina à 40%	1 ml
	Solução Fisiológica	79 ml
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3g
	Solução Fisiológica	100 ml

¹ P4170 – Sigma; ² C541 – Sigma

Preparo da Solução de Trabalho

Soluções	Quantidade
Solução de Citrato de Sódio	960 µl
Solução de Formaldeído	10 µl
Solução de Iodeto de Propídio	10 µl
Solução de Carboxifluoresceína	20 µl

(Adaptado de HARRISON e VICKERS, 1990)