

MARIA EDUARDA BORGES FIGUEIRA

**EFEITO DA DILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAMENTO SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE SÊMEN CONGELADO DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

F475e
2018

Figueira, Maria Eduarda Borges, 1992-
Efeito da diluição pós-descongelamento sobre a viabilidade
espermática de sêmen congelado de jumentos da raça Pêga /
Maria Eduarda Borges Figueira. – Viçosa, MG, 2018.
xv, 47 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 35-45.

1. Jumento. 2. Sêmen - Criopreservação.
3. Espermatozóides. 4. Glicerol. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

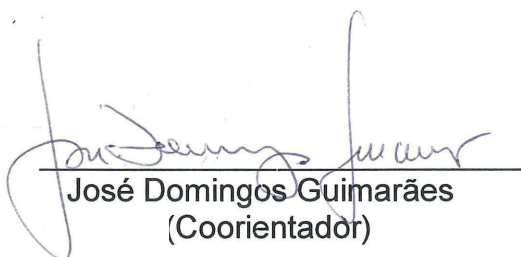
CDD 22. ed. 636.182

MARIA EDUARDA BORGES FIGUEIRA

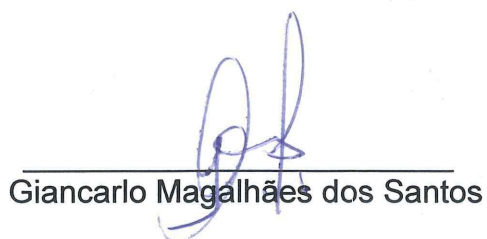
**EFEITO DA DILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAMENTO SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE SÊMEN CONGELADO DE JUMENTOS DA RAÇA PÊGA**

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

APROVADA: 09 de maio de 2018.



José Domingos Guimarães
(Coorientador)



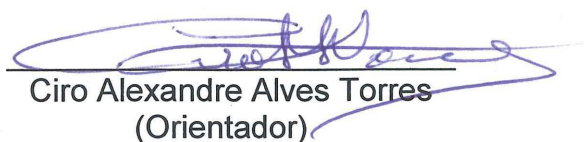
Giancarlo Magalhães dos Santos



Jurandy Mauro Penitente Filho



Bruna Waddington de Freitas



Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

“O sucesso está onde você enxerga. Se você faz coisas pequenas e se sente feliz, isso é sucesso.”

Victor Chaves

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Ele que me guia, me abençoa e me faz acordar todas as manhãs!

Agradeço aos meu pais, Maria Inês e Eduardo, e ao meu irmão Arthur, por sempre estarem ao meu lado, comprando minhas brigas, me ajudando e me apoiando incondicionalmente! Este trabalho não seria possível sem vocês! Amo muito vocês!

Aos demais membros da minha família, os Borges e os Figueiras! Vocês sempre acreditaram em mim e nunca deixaram faltar amor e conselhos!

Aos meus primos amados! Neto, Lipe, Dudu, Gabriel, Nina, Laura, Naty, Elis, Ivo, Lucas, Tati, Anne, Carol, Sávio, Badu, Louise, Daniel, Caio e Verena! Vocês foram fundamentais para tudo isso. Cada um de vocês tem um lugar muito especial no meu coração!

Ao Saulo, por me apoiar em todos os momentos e torcer junto comigo pra que tudo desse certo! Você é uma peça muito importante nisso tudo! Te amo!

Agradeço aos animais! Tudo até aqui foi dedicado a aprender sobre eles e juntamente a isso, aprendi com eles!

Agradecimento especial à Universidade Federal de Viçosa e ao DVT, onde tive o prazer de me formar em Medicina Veterinária, minha profissão dos sonhos!

Agradeço ao Departamento de Zootecnia e seus funcionários, que tão gentilmente abriram as portas para mim. Em especial à Fernanda, Venâncio, Rose, Gabriel, Vinícius e Alda que me ajudaram em inúmeras vezes.

Agradeço à FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudos, que foi imprescindível para que eu desenvolvesse meu trabalho.

Um grande agradecimento ao Professor Ciro Torres, meu orientador, que permitiu que eu trabalhasse com equídeos e me deu inúmeros conselhos! O senhor sempre esteve disponível e disposto a resolver todos os problemas para que tudo fosse feito da melhor maneira! Serei eternamente grata!

A todos que me ajudaram com conselhos, ideias, materiais, disposição e discussões, em especial à Bruna, Paula, Edgar, Jurandy, Carlos Thiago, Ítalo e Thiago. Sem vocês seria muito mais difícil!

À minha grande amiga e irmã que a Vet 11 me deu: Lorena! Que desde o primeiro dia da graduação estivemos juntas e sempre apoiando uma a outra!

Agradeço às Xeretas: Flávia, Amanda e Larissa! Vocês são muito especiais pra mim! Meu mestrado e minha vida tiveram um brilho a mais com a presença de vocês! Em especial à Flávia que, mesmo de longe, se dispôs a me ajudar de qualquer forma que fosse e eu sabia que poderia contar com ela! Obrigada meninas!

Agradeço aos meus amigos de longa data do Setor de Equideocultura: Maria, Carlos, Cristian, Mariana, Charles (*in memorian*), Manuela (*in memorian*), Pablo, Daniel, Iana e Ilana. Em especial à Maria, que desde que veio pra Viçosa quis nos ensinar tudo que sabia, sempre com disposição, dedicação e muita competência! Sem suas aulas talvez eu não me interessasse por reprodução!

Ao Setor de Equideocultura e seus funcionários: Cristian, Bernardo, Arcínio, Silvio, Roberto e Sebastião! Em especial ao Cristian, amigo de muito tempo, que agora é chefe do Setor e não mediu esforços para que tudo saísse como deveria! Muito obrigada!

Aos estagiários da Equídeo que sempre se disponibilizaram para ajudar nas análises e nos congelamentos! Amanda, Larissa, Lorraine, Kamilla, Bruno, Alê, Leandro Pedrosa, Bárbara, Iara, Mírian, Thiago Vieira, Ítalo, Gabriela, Lucas e Thiago Augusto, sem vocês eu não conseguiria!

Agradeço ao Fernando, ex-chefe da Equídeo, que me ajudou e ajudou a todos nós ex-estagiários de todas as formas! Com conselhos, conversas, brincadeiras, broncas e aulas sobre os animais e até sobre a vida!

Ao professor Giovanni, que me acolheu durante a graduação, me orientando na Iniciação Científica e me permitindo aprender cada vez mais!

Aos meus amigos veterinários: Luis Felipe, Sabrina, Fernando, Neilor, Annelyse, Julio e em especial à Silvinha, que desde a minha graduação me ensina e me ajuda! Foi um prazer ser estagiária e trabalhar com vocês!

Ao professor Marc Henry e à Universidade Federal de Minas Gerais por me ajudar permitindo que eu utilizasse suas instalações e equipamento para análise do CASA.

Ao professor Leandro Licursi e Palloma, que disponibilizaram instalações e tempo me auxiliando com as análises de citometria de fluxo.

À Botupharma, em nome do Junior e Dr. José Dell'aqua, por cederem os diluentes para congelamento e diluição pós-descongelamento.

Ao Sr. Luís Felipe Haddad e aos funcionários do Haras Tarumã, que gentilmente cederam animais e espaço, ajudando imensamente o meu trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Criopreservação de sêmen de equídeos.....	4
2.2. Diluentes.....	5
2.3. Crioprotetores.....	6
2.4. Plasma seminal.....	8
2.5. Rediluição de sêmen após o descongelamento.....	9
2.6. Avaliação espermática.....	10
2.6.1. CASA – Computer Assisted Sperm Analyser.....	10
2.6.2. Citometria de Fluxo.....	11
2.6.2.1. Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal.....	12
2.6.2.2. Avaliação de potencial de membrana mitocondrial.....	13
2.6.2.3. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Delineamento Experimental.....	15
3.2. Instalações e manejo dos animais.....	15
3.3. Colheita e avaliações imediatas do sêmen.....	16
3.4. Congelamento de sêmen e armazenamento do plasma seminal.....	17
3.5. Descongelamento de sêmen.....	18
3.6. Avaliação computadorizada de cinética espermática (CASA).....	19
3.7. Citometria de fluxo.....	20
3.7.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA)	20
3.7.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1)	21
3.7.3. Avaliação da produção de H ₂ O ₂ intracelular (DCFDA/IP)	21
3.8. Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Parâmetros seminais e avaliação computadorizada de cinética espermática (CASA).....	23

4.2. Citometria de Fluxo.....	27
4.3. Conclusões.....	32
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
ANEXOS.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ALH	Amplitude de deslocamento lateral de cabeça
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de batimento flagelar
CASA	Análise computadorizada do sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
DCFDA	Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Fluoresceína
g	Força centrífuga
Hz	Hertz
IP	Iodeto de propídeo
JC-1	5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-iodeto de carbocianato de tetraetilbenzomidazol
Kg	Quilogramas
L	Litro
LIN	Linearidade
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mOsm	Miliosmol
MOT	Motilidade total
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico

PMOT	Motilidade progressiva
PSA	<i>Pisum sativum</i>
Sptz	Espermatozoides
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características avaliadas no sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.

Tabela 2 - Parâmetros de cinética espermática do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga encontrados pelo programa *Sperm Class Analyzer* (SCA).

Tabela 3 - Frequência de Batimentos Flagelares (BCF) de sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga encontrados pelo programa *Sperm Class Analyzer* (SCA).

Tabela 4 - Porcentagem de categorias de células ALML, ALMI, AIMI e AIML de sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Tabela 5 - Porcentagem de células com acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra em sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Tabela 6 - Porcentagem de células espermáticas vivas e mortas e sua produção de peróxido de hidrogênio em sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Tabela 7 - Porcentagem de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Plasma seminal (sobrenadante) e pélete após a centrifugação do sêmen a 600 g por 15 minutos.

Figura 2 – Refrigerador Minitube® utilizado para resfriar as palhetas a 5 °C.

Figura 3 – Imagem de cinética espermática fornecida pelo *Sperm Class Analyzer* (SCA - Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha). Local: fazenda modelo da UFMG – Pedro Leopoldo, MG

RESUMO

FIGUEIRA, Maria Eduarda Borges, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2018. **Efeito da diluição pós-descongelamento sobre a viabilidade espermática de sêmen congelado de jumentos da raça Pêga.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientador: José Domingos Guimarães.

A criopreservação, apesar de apresentar vantagens, ainda possui limitações devido aos danos causados aos espermatozoides, sendo não só pela técnica de resfriamento como também pelo uso do glicerol. O glicerol é o crioprotetor mais utilizado em diluentes para congelamento e, apesar de proteger a célula contra a formação de cristais de gelo intracelulares, causa danos diretos e indiretos às células espermáticas. Também existe a hipótese de que o endométrio de jumentas seja sensível ao glicerol, sendo sua presença no sêmen descongelado um fator que diminui as chances da inseminação artificial ser bem-sucedida. A diluição pós-descongelamento é uma técnica que tem como objetivo diminuir os efeitos deletérios do glicerol sobre os espermatozoides e sobre o endométrio das jumentas, fazendo com que o crioprotetor seja diluído e/ou retirado dos espermatozoides. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da diluição pós-descongelamento de sêmen de asininos sobre a viabilidade espermática *in vitro*. Foram utilizados vinte e cinco ejaculados de cinco jumentos, os quais foram divididos em 4 tratamentos: controle: sem diluição pós-descongelamento; BS: diluição pós-descongelamento com diluente comercial à base de leite em pó BotuSêmen®; PS: diluição pós-descongelamento com plasma seminal; e BS+PS: diluição pós-descongelamento com diluente comercial à base de leite em pó BotuSêmen® + plasma seminal. A avaliação da cinética espermática foi realizada por meio do *Computer Assisted Sperm Analyser* (CASA) onde foram avaliados os seguintes parâmetros: MOT (motilidade total, %), PMOT (motilidade progressiva, %), VAP (velocidade de trajeto, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade progressiva, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimentos flagelares, Hz), STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %). O sêmen descongelado também foi submetido a avaliação pelo citômetro de fluxo por meio da utilização de sondas fluorescentes onde foram avaliados: integridade de membrana plasmática e acrossomal (FITC-PSA/IP), produção de peróxido de hidrogênio intracelular

(DCFDA) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1). Os resultados para cinética espermática mostraram que os parâmetros MOT, PMOT, LIN e STR não diferiram entre as amostras dos tratamentos ($P>0,05$). Os parâmetros de VCL, VSL, VAP foram maiores ($P<0,05$) em BS ($53,0 \pm 3,1$, $41,8 \pm 2,7$, $45,8 \pm 2,8$, respectivamente) do que para as amostras do grupo controle ($46,4 \pm 2,3$, $37,3 \pm 1,8$, $41,1 \pm 2,0$, respectivamente). As variáveis ALH e BCF foram maiores ($P<0,05$) nos grupos BS e BS+PS ($2,2 \pm 0,1$ e $2,1 \pm 0,1$, respectivamente para ALH; $9,5 \pm 0,2$ e $9,3 \pm 0,2$ respectivamente para BCF) em relação aos grupos controle e PS ($1,7 \pm 0,1$ e $1,8 \pm 0,1$ respectivamente para ALH; $8,1 \pm 0,2$ e $8,4 \pm 0,1$ respectivamente para BCF). Na análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal, o grupo controle foi o que apresentou menor $P<0,05$) número de células com acrossoma e membrana plasmática lesionados ($41,85 \pm 3,46$), seguido pelos grupos PS ($51,83 \pm 3,00$), BS ($56,76 \pm 3,02$) e BS+PS ($61,38 \pm 3,09$). Na avaliação da produção intracelular de peróxido de hidrogênio, o grupo controle foi o que apresentou menor ($P<0,05$) porcentagem de células mortas com produção de H_2O_2 ($75,28 \pm 2,18$), seguido pelos grupos BS e PS que não diferiram entre si ($77,96 \pm 1,40$ e $78,99 \pm 1,38$ respectivamente) e pelo grupo BS+PS ($79,07 \pm 1,18$). Na avaliação de potencial de membrana mitocondrial, o grupo controle apresentou a maior porcentagem de células com bom potencial mitocondrial ($41,92 \pm 5,79$), seguido pelo grupo BS ($38,23 \pm 5,96$) e pelos grupos BS+PS e PS que não diferiram entre si ($P>0,05$) ($36,78 \pm 5,39$ e $36,32 \pm 5,68$ respectivamente). A diluição pós-descongelamento preservou as características de motilidade total e progressiva do sêmen descongelado, mas não foi capaz de preservar a integridade de membrana plasmática e acrossomal, o potencial de membrana mitocondrial, assim como não reduziu a produção de peróxido de hidrogênio e seus efeitos sobre os espermatozoides descongelados de jumentos da raça Pêga.

ABSTRACT

FIGUEIRA, Maria Eduarda Borges, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2018. **Effect of post-thaw dilution on sperm viability of frozen sêmen of Pêga donkeys.** Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-adviser: José Domingos Guimarães.

Cryopreservation, although presenting advantages, still has limitations in equidae by causing damages to spermatozoa, being these damages caused not only by the cooling technique but also by glycerol. Glycerol is the most commonly used cryoprotectant in freezing diluents and, while protecting the cell against intracellular ice crystal formation, it causes direct and indirect damage to the sperm cell. It is also hypothesized that the uterus of donkeys is sensitive to glycerol, and its presence in thawed semen is a factor that decreases the chances of successful artificial insemination. The post-thaw dilution is a technique that aims to reduce the deleterious effects of glycerol on the sperm and to the uterus of donkeys, causing the cryoprotectant to be diluted and / or removed from the spermatozoa. The objective of this study was to evaluate the effects of post-thaw dilution on asinine semen on sperm viability *in vitro*. Twenty-five ejaculates were used from five donkeys, being divided into four treatments: control: without post-thaw dilution; BS: post-thaw dilution with commercial milk-based diluent BotuSêmen®; PS: post-thaw dilution with seminal plasma; and BS + PS: post-thaw dilution with commercial milk-based diluent BotuSêmen® + seminal plasma. The analysis of sperm kinetics was performed using computer assisted sperm analyzer (CASA), MOP (total motility, %), PMOT (progressive motility, %), VAP (trajectory velocity, $\mu\text{m} / \text{s}$), VSL (linear velocity, $\mu\text{m} / \text{s}$), VL (curvilinear velocity, $\mu\text{m} / \text{s}$), ALH (amplitude of lateral head displacement, μm), BCF (beat cross frequency, Hz), STR (straightness, %), LIN (linearity, %). The thawed semen was also submitted to an evaluation by the flow cytometer using fluorescence probes where the following were evaluated: plasma membrane and acrosomal membrane (FITC-PSA), intracellular hydrogen peroxide production (DCFDA) and mitochondrial membrane potential (JC-1). The results for spermatoc kinetics showed that the parameters MOT, PMOT, LIN and STR did not differ among treatments ($P > 0.05$). VCL, VSL and VAP parameters were significantly higher in

BS (53.0 ± 3.1 , 41.8 ± 2.7 , 45.8 ± 2.8 , respectively) than in the control group (46.4 ± 2.3 , 37.3 ± 1.8 , 41.1 ± 2.0 , respectively). ALH and BCF variables were significantly higher ($P < 0.05$) in BS and BS + PS groups (2.2 ± 0.1 and 2.1 ± 0.1 , respectively for HL, 9.5 ± 0.2 and 9.3 ± 0.2 respectively for BCF) than in the groups control and PS (1.7 ± 0.1 and 1.8 ± 0.1 respectively for ALH, 8.1 ± 0.2 and 8.4 ± 0.1 respectively for BCF). In the analysis of plasma and acrosomal membrane integrity, the control group presented the lowest number of cells with acrosome and plasma membrane lesions (41.85 ± 3.46), followed by PS (51.83 ± 3.00), BS (56.76 ± 3.02) and BS + PS (61.38 ± 3.09). In the evaluation of the intracellular production of hydrogen peroxide, the control group had the lowest percentage of dead cells with H_2O_2 production (75.28 ± 2.18), followed by BS and PS groups that did not differ (77.96 ± 1.40 and 78.99 ± 1.38 respectively) and by the BS + PS group (79.07 ± 1.18). In the evaluation of mitochondrial membrane potential, the control group had the highest percentage of cells with good mitochondrial membrane potential (41.92 ± 5.79), followed by BS (38.23 ± 5.96) and BS + PS and PS groups, which did not differ statistically (36.78 ± 5.39 and 36.32 ± 5.68 , respectively). The post-thaw dilution preserved the total and progressive motility characteristics of the thawed semen but was not able to preserve the plasma and acrosomal membrane integrity, the mitochondrial membrane potential, did not reduce the production of hydrogen peroxide and its effects on the thawed spermatozoa of the Pêga donkeys.

1. INTRODUÇÃO

O rebanho de asininos no Brasil segundo a FAO (2014) é de cerca de 1,2 milhões de animais. No total, o rebanho de equídeos brasileiro está em torno de 7,8 milhões de cabeças, sendo que, somente o mercado equino movimenta 16 bilhões de reais por ano no país (CEPEA & MAPA, 2013), mostrando a importância deste setor no agronegócio brasileiro.

Para que o crescimento do rebanho equídeo brasileiro se tornasse tão significativo, foi necessário o uso de biotecnologias reprodutivas como a inseminação artificial (IA), que permite maior aproveitamento do sêmen coletado.

Com isso, a valorização de asininos no Brasil tem se tornado crescente, principalmente em relação à raça Pêga, visto que, os animais apresentam crescente seleção para andamento e morfologia, se apresentando em competições pelo país (MACHADO, 2010). Também são valorizados pela produção de muares, muito utilizados para trabalho nas propriedades rurais por possuírem força e resistência (CANISSO *et al.*, 2010).

A criopreservação de gametas tem sido objeto de estudo para biotecnologia reprodutiva em asininos, pois possibilita o armazenamento do sêmen de animais superiores. Em adição, muitas raças asininas estão em risco de extinção, e a criopreservação de sêmen pode auxiliar a criar um banco genético para a manutenção destas raças (TRIMECHE *et al.*, 1998; CANISSO *et al.*, 2008a; ROTA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Entretanto, o congelamento de sêmen asinino apresenta baixas taxas de fertilidade quando comparado ao sêmen fresco e resfriado (VIDAMENT *et al.*, 2009). Esta diferença pode ser devido aos processos pelos quais as células espermáticas são submetidas durante o protocolo de congelamento. Entre os quais se cita: centrifugação, choque térmico e formação de cristais de gelo, que causam diminuição na qualidade espermática.

A utilização de crioprotetores nos meios de congelamento é uma alternativa utilizada para atenuar os efeitos deletérios do processo de criopreservação. O

crioprotetor mais utilizado atualmente é o glicerol, que é um crioprotetor permeável. Portanto atua no interior da célula, não permitindo que haja desidratação excessiva da mesma durante sua exposição ao meio de congelamento altamente concentrado. No entanto, o glicerol é tóxico para a célula espermática (TRIMECHE *et al.*, 1998), causando danos que variam entre alterações no citoesqueleto de actina, desnaturação de proteínas e alteração de glicocálix e proteínas superficiais da célula espermática (HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992; MACÍAS GARCÍA *et al.*, 2012). Também existe a hipótese de que o endométrio de jumentas seja sensível ao glicerol, causando uma baixa taxa de prenhez nestas quando comparado à inseminação artificial com sêmen congelado em éguas (VIDAMENT *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Na tentativa de reduzir estes efeitos deletérios causados pelo glicerol, a diluição pós-descongelamento tem-se mostrado uma alternativa. Este procedimento tem o objetivo de diluir ou retirar o glicerol após o descongelamento do sêmen para inseminação artificial. Trimeche *et al.* (1998) só obtiveram prenhez de jumentas após a remoção do crioprotetor pela diluição após o descongelamento.

Para realizar esta diluição pós-descongelamento podem ser utilizados o diluidor à base de leite em pó e o plasma seminal (ROTA *et al.*, 2012; FERNANDES, 2012; SABATINI *et al.*, 2014; ROTA *et al.*, 2017). O primeiro é comumente utilizado para diluição e armazenamento de sêmen fresco e resfriado e possui fonte de energia para a célula espermática, além de promover o controle de osmolaridade, de pH, possuir antimicrobianos em sua fórmula e proteger as células contra o choque térmico do resfriamento. Já o plasma seminal é a fração do ejaculado na qual os espermatozoides estão diluídos e contém inúmeras substâncias como íons, proteínas, aminoácidos, frutose, ácido cítrico, lipídeos, enzimas, antimicrobianos e imunoglobulinas (GARNER & HAFEZ, 2004).

No entanto, mesmo com os estudos realizados, ainda há divergências quanto ao uso da diluição pós-descongelamento, pois enquanto alguns trabalhos evidenciam benefícios deste procedimento para os parâmetros espermáticos (TRIMECHE *et al.*, 1998; ROTA *et al.*, 2012; SABATINI *et al.*,

2014; FERNANDES, 2012; SARAGUSTY *et al.*, 2017), outros não obtiveram o mesmo resultado (VIDAMENT *et al.*, 2009; ORTIZ *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivos principais a avaliação *in vitro* dos efeitos decorrentes da diluição pós-descongelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga quanto aos parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento e diluição, juntamente com avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Criopreservação de sêmen de equídeos

O congelamento de sêmen é uma técnica amplamente empregada na espécie bovina com bons resultados, porém, em se tratando dos equídeos os resultados não foram bons, podendo ser devido a problemas fisiológicos inerentes à espécie prejudicando esta técnica, não gerando assim boas taxas de fertilidade após a inseminação artificial (IA) (TRIMECHE *et al.*, 1998; VIDAMENT *et al.*, 2009; CANISSO, *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

A criopreservação de sêmen é composta de muitas etapas que podem causar danos aos espermatozoides. Entre as quais se citam: centrifugação, queda de temperatura, estresse osmótico, toxicidade dos crioprotetores e formação de cristais de gelo (CANISSO *et al.*, 2008b). Há também muitos fatores que podem influenciar o sucesso desta técnica, como: meio diluidor; curva de congelamento (TERRACIANO *et al.*, 2008), número de espermatozoides por palheta (CONTRI *et al.*, 2012), diferença entre raças (GOMES *et al.*, 2002), diferença entre animais e ejaculados de um mesmo animal (MIRÓ *et al.*, 2009; ROTA *et al.*, 2017); diferença entre épocas do ano (CONTRI *et al.*, 2010), local da IA e número de espermatozoides por dose inseminante (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Para a realização do processo de congelamento, o sêmen deve ser centrifugado, o pélete ressuspendido em meio diluente específico para congelamento, envasado em palhetas e passar pela curva de resfriamento e congelamento até ser armazenado a -196 °C.

A curva de resfriamento e congelamento contém pontos críticos, de estresse térmico para os espermatozoides. O primeiro ponto crítico é quando a temperatura está entre 18 °C e 1 °C, pois nesta faixa de temperatura a membrana plasmática da célula passa do estado líquido cristalino para o estado gel (AMANN e PICKET, 1987; HAMMERSTEDT, 1990).

Entre -5 °C e -10 °C ocorre a formação de cristais de gelo extracelulares, com isso, os solutos presentes no meio se concentram entre estes cristais, formando canais com espermatozoides e uma solução altamente concentrada. Consequentemente ocorre uma desidratação das células espermáticas, devido

ao gradiente osmótico que é criado entre o ambiente intracelular isotônico e o meio extracelular hipertônico. Por este motivo, neste momento a curva de congelamento deve ser devidamente ajustada, pois caso seja muito rápida, não ocorrerá desidratação suficiente e haverá formação de cristais de gelo intracelulares, causando lesões. Caso a curva de congelamento seja muito lenta, ocorrerá uma desidratação excessiva, pois quando a célula permanece muito tempo em contato com o meio concentrado ocorre o colapso de membrana (MAZUR, 1990).

Para tentar controlar as curvas de congelamento de forma mais adequada, equipamentos automatizados de congelamento de sêmen estão sendo utilizados. Oliveira *et al.* (2016) observaram melhores resultados para parâmetros de cinética espermática utilizando o sistema automatizado de congelamento de sêmen. De acordo com Terraciano *et al.* (2008) o sistema automatizado de congelamento também causou menos danos às células espermáticas do que o modo de congelamento de Kenney e colaboradores (1983).

2.2. Diluentes

Para que o processo de criopreservação de sêmen seja realizado com sucesso, é necessário que se utilize o diluidor de maior eficiência, pois é este o responsável por fornecer as condições para que a célula espermática sobreviva ao congelamento. Segundo Amann e Pickett (1987) e Silva Filho (1994), um bom diluidor para sêmen de equídeos deve proporcionar: pressão osmótica compatível com a célula espermática, apropriado equilíbrio mineral, combinação adequada de nutrientes, capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos, crioprotetores, capacidade de estabilizar membranas e sistemas enzimáticos, ausência de micro-organismos patogênicos, baixo custo, fácil aquisição, baixa irritabilidade aos órgãos genitais, e não oferecer toxicidade ao espermatozoide.

Os diluidores básicos utilizados para equídeos contêm: tampões, antimicrobianos, antioxidantes, leite ou gema de ovo, substâncias não iônicas, açúcares e água.

Um dos fatores fundamentais para que o diluidor seja considerado ideal é a manutenção do pH e osmolaridade do espermatozoide, que vão de 6,7 a 6,9 e 350 mOsmol/L respectivamente. O que não ocorre com os extensores de congelamento, pois sua osmolaridade varia de 300 a 400 mOsmol/L, e seu pH de 6,7 a 7,2. Este é um dos fatores que influencia diretamente na sobrevivência do espermatozoide (BLANCHARD *et al.*, 2003).

Os diluidores mais utilizados para equídeos são os derivados do leite desnatado e outros à base de gema de ovo e soluções poli-iônicas em menor escala (CARVALHO, 1992; BOETA & QUINTERO, 2000; VIDAMENT, 2005; SNOECK *et al.*, 2007; VIDAMENT, *et al.*, 2008).

As macromoléculas da gema do ovo e do leite auxiliam na proteção ao choque térmico. E os detergentes presentes no diluidor auxiliam na solubilização destes lipídeos, permitindo maior interação destes com a membrana plasmática dos espermatozoides (PICKETT E AMANN, 1993).

A gema de ovo atua na criopreservação por meio das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alto peso molecular (MAYER & LASLEY, 1945; PARKS E GRAHAM, 1992; AMANN E GRAHAM, 1993; WATSON, 1995). Estas são compostas de aproximadamente 65,5 % de triglicerídeos, 28,3 % de fosfolipídios e 5,2 % de colesterol (SOUZA-SOARES E SIEWERDT, 2005).

Os diluidores à base de leite atuam na criopreservação por meio das lipoproteínas do leite. Bergeron *et al.* (2007) concluíram que as caseínas do leite reduzem a ligação das proteínas do plasma aos espermatozoides, reduzindo a perda de colesterol para o meio durante o processo de congelamento.

2.3. Crioprotetores

Os agentes crioprotetores (ACPs) são substâncias de grande interesse na pesquisa reprodutiva, visto que são os responsáveis por proteger a célula espermática durante o processo de congelamento.

Um bom crioprotetor deve possuir baixo peso molecular, alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular (ASHWOOD-SMITH, 1987; KEITH, 1998). Estas substâncias são classificadas em: penetrantes e não penetrantes, e diferem pelo seu tamanho e capacidade de penetrar ou não na célula. Entre os crioprotetores penetrantes podemos citar: glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO) e etilenoglicol. Entre os ACPs não penetrantes cita-se: açúcares, proteínas do leite e gema de ovo.

O mecanismo de ação dos ACPs traduz-se pela sua capacidade coligativa com a água, ou seja, sua capacidade de se ligar com o hidrogênio da molécula de água. Isso torna a solução mais viscosa, reduzindo seu ponto de congelação, evitando a desidratação excessiva da célula e a formação de cristais de gelo intracelulares (JAIN & PAULSON, 2006; WATSON, 1981). Também tem a capacidade de atuar na membrana das células estabilizando o complexo: água, lipídeo e proteína (ROWE, 1966).

O ACP penetrante mais comumente utilizado na criopreservação de gametas é o glicerol. Sua capacidade crioprotetora foi descoberta por Polge *et al.* (1949) quando tentavam realizar a criopreservação do sêmen de touros.

O glicerol é classificado quimicamente como um álcool e possui três grupos hidroxilas capazes de se ligar ao grupo de hidrogênio da molécula de água.

Apesar de amplamente utilizado, o glicerol possui efeito tóxico sobre a célula espermática como alterações no citoesqueleto de actina, desnaturação de proteínas e alteração de glicocálix e proteínas superficiais (HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992; MACÍAS GARCÍA *et al.*, 2012).

Além disso, existe a hipótese de que o glicerol seja tóxico para o ambiente uterino de jumentas, sendo responsável pelas suas baixas taxas de fertilidade, quando comparado com a IA em éguas. Vidament *et al.* (2009) observaram que jumentas inseminadas com sêmen descongelado de jumentos tiveram taxa de fertilidade de 11 %, enquanto que, éguas inseminadas nas mesmas condições tiveram uma taxa de fertilidade de 36 %. Em comparação, Canisso *et al.* (2011)

obtiveram taxa de prenhez em éguas de 53 % utilizando sêmen criopreservado de jumentos da raça Pêga.

Apesar dos estudos diferirem em resultados, outros ACPs como as amidas e o etilenoglicol (EG) são sugeridos como alternativas para o glicerol (BALL & VO, 2001; MANTOVANI *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004; FERNANDES, 2012).

2.4. Plasma Seminal

O sêmen é composto de duas frações: os espermatozoides e o plasma seminal. Este é a parte líquida do sêmen, sendo formado a partir de secreções das glândulas sexuais acessórias e epidídimo.

O plasma seminal é composto por diversas substâncias entre proteínas, íons (sódio, cloreto, potássio, cálcio, magnésio), enzimas (catalase, superóxido dismutase e sistema glutathione peroxidase/reductase), sorbitol, inositol, ergotionina, hormônios, frutose, aminoácidos, ácido cítrico e imunoglobulinas (BALL *et al.*, 2000; TURNER & MCDONNELL, 2003; GARNER & HAFEZ, 2004).

O procedimento de criopreservação de sêmen de equídeos requer a retirada do plasma seminal por centrifugação, visto que, diversos estudos demonstraram os efeitos deletérios do plasma sobre os espermatozoides criopreservados (BRINSKO, CROCKETT & SQUIRES, 2000; BARRETO, 2007; KARESKOSKI & KATILA, 2008). Além disso, a retirada do plasma seminal permite que haja aumento na concentração de espermatozoides diluídos em meio de congelamento, diminuindo assim o volume por dose inseminante.

Almeida (2006) utilizando diferentes concentrações de plasma seminal (0, 5, 25 e 50 %) para avaliar a proteção contra estresse oxidativo em espermatozoides equinos durante a criopreservação, verificou que baixas concentrações de plasma seminal protegem as células espermáticas contra a peroxidação lipídica. No entanto, em concentrações acima de 25 % há uma diminuição da viabilidade dos espermatozoides.

Aurich *et al.* (1996) observaram que a adição de plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade ao sêmen de animais de baixa congelabilidade após seu descongelamento melhorou seu parâmetro de motilidade. Também foi observado pelos autores que a adição do plasma seminal dos garanhões de baixa congelabilidade ao sêmen descongelado de garanhões de alta congelabilidade causou queda na motilidade espermática.

Foi indicado por Morrell *et al.* (2014) que a adição de plasma seminal ao sêmen deve ser feita após o seu descongelamento, logo antes da IA e não antes da criopreservação, pois foi observado aumento de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos na cromatina dos espermatozoides quando o plasma foi adicionado antes do processo de congelamento.

Os componentes do plasma seminal dos equídeos ainda não estão completamente elucidados. E embora a técnica de criopreservação tenha como uma de suas etapas a retirada do plasma seminal na centrifugação, ainda existe uma variabilidade nos resultados obtidos entre estudos sobre o plasma seminal. Isto se dá por diferenças nos métodos de pesquisa, variação da composição do plasma seminal entre indivíduos da mesma espécie (MORRELL *et al.*, 2014) e ejaculados do mesmo animal (AMANN *et al.*, 1987).

2.5. Rediluição de sêmen após o descongelamento

A rediluição do sêmen após seu descongelamento tem como objetivo a diluição dos crioprotetores presentes no meio, reduzindo os efeitos deletérios dos mesmos sobre as células.

Esta técnica permite o uso de soluções que contém osmolaridade mais compatível com a célula espermática, visto que, os diluidores utilizados para criopreservação possuem a osmolaridade muito elevada em relação à célula (300 a 400 mOsmol/L).

Trimeche *et al.* (1998) somente obtiveram prenhez de jumentas após a retirada do glicerol com a diluição logo após o descongelamento.

Vidament *et al.* (2009) também obtiveram sucesso ao inseminar jumentas com sêmen descongelado diluído em leite após seu descongelamento ou lavados com leite, e Saragusty *et al.* (2017) constataram que a rediluição do sêmen congelado de jumentos após seu descongelamento utilizando diluidor à base de leite em pó resultou num aumento da viabilidade do sêmen após 3h de incubação a 37 °C.

Fernandes (2012) constatou melhora de motilidade do sêmen descongelado de jumentos diluído em plasma seminal quando comparado ao sêmen não diluído ou rediluído com diluidor à base de leite em pó após o descongelamento.

Rota *et al* (2012) observaram uma tendência de maior fertilidade do sêmen rediluído de jumentos após descongelamento com plasma seminal (61,5 %) quando comparado ao sêmen rediluído com diluidor à base de leite em pó (23,1 %) e ao sêmen não rediluído (20,0 %).

No entanto, Sabatini *et al* (2014) não observaram melhora nos parâmetros seminais com a adição de 70 % de plasma seminal após o descongelamento do sêmen de jumentos.

2.6. Avaliação Espermática

2.6.1. CASA – Computer Assisted Sperm Analyser

A utilização de softwares e aparelhos capazes de analisar os parâmetros de cinética espermática fez com que os resultados obtidos nos estudos e pesquisas se tornassem mais acurados, permitindo avaliar cada amostra e cada indivíduo ou até dividindo a população espermática em subpopulações.

A avaliação é feita por meio de imagens do movimento da cabeça do espermatozoide, que é identificada na imagem do microscópio por meio do software utilizado. São feitas diversas capturas de imagens seguidas e estas então são unidas para formar a trajetória do espermatozoide.

Entretanto, visto que existe a probabilidade de erro em toda a análise laboratorial, deve-se tomar medidas para que a avaliação espermática seja feita com a melhor técnica. O ajuste da concentração utilizada para a análise

deve ser levado em conta, sendo esta concentração preconizada entre 5 e 50 x 10⁶ espermatozoides/mL para que o aparelho consiga realizar a diferenciação entre os espermatozoides. Também deve ser realizado o ajuste do *setup* e do *software* do aparelho para a determinada espécie a ser estudada, visto que existem diferenças significativas entre as características espermáticas de cada uma delas. O uso de diluidores ideais para esta análise também deve ser preconizado, uma vez que diluidores de congelamento podem conter alto número de partículas suspensas que prejudicam a diferenciação entre estas e as células espermáticas pelo aparelho (MORTIMER, 1997).

Embora a análise subjetiva da motilidade espermática seja amplamente utilizada e apresente vantagens como menor custo e fácil execução, esta não permite uma observação mais detalhada da cinética espermática (JØRGENSEN, *et al.*, 1997).

Segundo Sousa (2002), o CASA pode avaliar a população espermática nos seguintes aspectos: MOT (motilidade total – porcentagem de células em movimento), PMOT (motilidade progressiva – porcentagem de células em movimento progressivo), VAP (velocidade de trajeto média dos espermatozoides em $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade progressiva entre dois pontos de trajeto dividido pelo tempo gasto para realizar o trajeto em $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea que representa a trajetória real dos espermatozoides em $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude média de deslocamento lateral da cabeça em μm), BCF (frequência de batimentos flagelares em Hz), STR (retilinearidade do percurso, média entre VSL/VAP em %), LIN (linearidade, relação entre VSL/VCL).

Apesar de o CASA fornecer informações importantes sobre cinética espermática, não houve um consenso entre pesquisadores de quais parâmetros são indicadores reais de fertilidade *in vivo*.

2.6.2. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo permite avaliar o status metabólico e estrutural de células espermáticas, fornecendo informações importantes para a avaliação

dos efeitos da criopreservação sobre estruturas moleculares e metabolismo dos espermatozoides.

Esta técnica é capaz de separar, contar, avaliar e classificar partículas microscópicas em meio líquido em fluxo. É uma análise multiparamétrica, sendo que avalia a célula por três parâmetros: Forward SCatter (FSC) mede o tamanho relativo da célula, Side SCatter (SSC) avalia a granulosidade da célula e FL mede a intensidade de fluorescência. Os dois primeiros parâmetros, FSC e SSC, são avaliados pela dispersão frontal e lateral do laser respectivamente. Enquanto que a intensidade de fluorescência depende da sonda utilizada, de sua emissão e absorbância de luz.

A citometria de fluxo é formada por um conjunto de três sistemas: fluido, óptico e eletrônico. O sistema fluido é composto da parte do aparelho que realiza a sucção da solução para que as células sejam avaliadas pelo sistema óptico. O sistema óptico gera e coleta os sinais de luz. E o sistema eletrônico converte os sinais ópticos em sinais eletrônicos para a análise do computador.

A maioria das avaliações espermáticas é baseada em motilidade total e progressiva das células espermáticas. No entanto existem estudos que confirmam que a motilidade total e progressiva fornecidas pelo CASA não são altamente relacionadas com fertilidade *in vivo* na maioria das espécies (SAMPER *et al.*, 1991; BAILEY *et al.*, 1994). A associação entre as análises do CASA e do citômetro de fluxo podem fornecer uma complementariedade de informações, tornando a avaliação espermática mais acurada.

2.6.2.1. Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal

A membrana plasmática é um componente muito importante na estrutura e função do espermatozoide. Envolve toda a célula e é responsável por trocas de substâncias entre a célula e o meio, interação entre células, proteção da célula espermática, etc. A membrana acrossomal é também de grande importância, pois no acrossoma estão contidas enzimas utilizadas na fecundação do

ovócito. A manutenção destas membranas é vital para a fertilização, visto que, danos em sua estrutura podem levar à perda de função celular.

Dentre os corantes mais utilizados para esta análise podemos citar o iodeto de propídeo (IP) e lecitinas de plantas (PNA – *Arachis hypogaea*; PSA – *Pisum sativum*) associadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

O IP tem afinidade com o DNA da célula, porém é um fluorocromo impermeável. Portanto só consegue se ligar ao DNA quando há solução de continuidade de membrana plasmática do espermatozoide. Quando isto ocorre, é emitida uma fluorescência vermelha (HARRISON E VICKERS, 1990; ARRUDA *et al.*, 2011).

As aglutininas (PNA e PSA) possuem afinidade por carboidratos presentes na membrana acrossomal externa e são utilizadas para detectar espermatozoides já capacitados, ou seja, que já iniciaram a reação acrossomal. A FITC é um fluorocromo verde que é associado às aglutininas para possibilitar a visualização da reação (ARRUDA *et al.*, 2010).

Ao utilizar a conjugação de FITC-PSA/PNA com IP, as células podem ser divididas em quatro quadrantes ou quatro populações celulares. No quadrante 1 (FITC-PSA-/IP+), membrana plasmática lesada e membrana acrossomal não reagida; quadrante 2 (FITC-PSA+/IP-), membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal reagida; quadrante 3 (FITC-PSA-/IP-), membrana plasmática íntegra e membrana acrossomal não reagida; quadrante 4 (FITC-PSA+/IP+), membrana plasmática lesada e membrana acrossomal reagida (CELEGHINI *et al.*, 2007).

2.6.2.2. Avaliação de potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria é a organela responsável pela produção de ATP na célula, e produz quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio. Estas podem lesar a célula espermática quando em grandes quantidades, o que torna a avaliação do potencial mitocondrial um indicativo dos danos gerados à célula pela criopreservação (PEÑA *et al.*, 2016).

Embora a relação de potencial mitocondrial com fertilidade ainda não esteja bem elucidada, o mesmo tem correlação com o potencial energético da célula e com motilidade (MARTINEZ-PASTOR, 2004), o que pode relacioná-lo com a fertilidade (TSAKMAKIDIS *et al.*, 2010).

A sonda JC-1 é utilizada para identificar o potencial mitocondrial do espermatozoide. Quando o potencial de membrana é alto a emissão de fluorescência é de cor laranja-avermelhada, e quando o potencial de membrana é de média a baixo é emitida uma fluorescência verde (VARNER *et al.*, 2008; MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2004).

2.6.2.3. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas durante o metabolismo da célula espermática e realizam funções fisiológicas dependendo de suas concentrações intracelulares. Uma de suas funções é possibilitar a capacitação espermática por meio do gatilho para seu início. A capacitação é desejada quando ocorre *in vivo*, mas para a criopreservação esse processo é indesejável, visto que, esta vai ocorrer no laboratório, portanto sem a participação dos órgãos reprodutivos da fêmea e causar deterioração dos espermatozoides congelados.

Para avaliar a produção de EROs, uma das sondas utilizadas é o diacetato de diclorodihidrofluoresceína ou DCFDA. Esta pode difundir facilmente pela membrana plasmática e sofre oxidação pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) emitindo fluorescência verde (FREITAS, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 5 jumentos hígidos da raça Pêga, com a colheita de 5 ejaculados de cada animal, totalizando 25 ejaculados. Os animais tinham idade entre 3 e 10 anos e pertenciam ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, situado na cidade de Viçosa – MG, latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste, e ao Haras Tarumã, situado na cidade de Guaraciaba – MG, latitude 20°34'15" sul e longitude 43°00'28" oeste. Todos os animais foram considerados férteis pelo exame andrológico e histórico de prenhez por meio de monta natural.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA/UFV (protocolo 25/2017, aprovado no dia 27/06/2017).

3.2. Instalações e manejo dos animais

Durante o período experimental os animais foram mantidos em baias de dimensões de 16 m², as quais continham cochos para alimento, água e sal mineral *ad libitum*. As baias possuíam extensões para piquetes compostos de capim Tifton e Coast cross (*Cynodon spp*). O arraçoamento dos animais foi realizado duas vezes ao dia sendo fornecido capim elefante picado (*Pennisetum purpureum* cv *Cameroon* e cv *Napier*) e concentrado que atendia às exigências do NRC (2007).

3.3. Delineamento experimental

Após a colheita, os ejaculados foram avaliados e apenas aqueles que apresentaram motilidade e vigor acima de 70 % e 3, respectivamente, foram selecionados para prosseguir para a etapa de congelamento.

Após o descongelamento, as amostras foram divididas em 4 grupos experimentais:

Controle – sem diluição pós-descongelamento

G1 – diluído com 10 % v/v de Plasma Seminal

G2 – diluído em proporção 1:1 com diluidor comercial à base de leite em pó BotuSêmen (Botupharma®, Botucatu, Brasil)

G3 – diluído com 10 % v/v de Plasma Seminal + 1:1 de BotuSêmen (Botupharma®, Botucatu, Brasil)

3.4. Colheita e avaliações imediatas de sêmen

Antes do início das colheitas experimentais os jumentos foram submetidos a colheitas diárias por 5 dias consecutivos. Depois foi realizado um descanso sexual de 2 dias antes do período experimental.

A colheita total do sêmen foi realizada por meio de vagina artificial modelo Botupharma® (Biotech, Botucatu, Brasil). Para separação da fração gel do ejaculado foi utilizado filtro de nylon (Minitube®) acoplado ao copo coletor durante a colheita. Realizou-se a limpeza do pênis com água limpa antes de cada colheita para retirada de impurezas e redução da contaminação do sêmen. As colheitas foram realizadas com intervalo de 48 horas.

Após a colheita, o sêmen foi transportado ao laboratório para realização de análises de parâmetros seminais.

O volume seminal foi avaliado com auxílio de proveta graduada de 300 mL. O aspecto foi classificado em aquoso, opalescente e leitoso.

Motilidade espermática total, progressiva retilínea e circular e vigor espermático foram analisados com auxílio de microscópio óptico com aumentos de 100 e 400 vezes. Pela deposição de 10 µL de sêmen em uma lâmina pré-aquecida a 37 °C, o sêmen foi avaliado pelo método por profissionais experientes.

A concentração espermática foi avaliada com auxílio da câmara de Neubauer. O sêmen foi diluído em duas proporções diferentes em água destilada: 1:20 (50 µL de sêmen para 950 µL de água destilada) no caso de sêmen com aspecto aquoso ou opalescente, e 1:100 (10 µL de sêmen para 990 µL de água destilada) no caso de aspecto leitoso.

A morfologia espermática foi avaliada por meio de amostra de 100 µL de sêmen diluída em 1 mL de solução formol-salino previamente aquecida a 37 °C

(HANCOCK, 1957). Desta solução, 10 μ L foram depositados em lâmina de vidro e observados em microscópio de contraste de fase com aumento de 1000 vezes. Foram contadas 200 células e os defeitos classificados em maiores, menores e totais.

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática foi realizada por meio de teste hiposmótico (HOST), no qual 100 μ L de sêmen foram diluídos em 1 mL de água destilada, sendo esta solução incubada em banho-maria por 15 minutos a 37 °C. Transcorrido o tempo de incubação a amostra foi fixada com 0,5 mL da solução de formol-salino (HANCOCK, 1957). Na análise, todas as células espermáticas apresentando dobra ou enrolamento de cauda foram consideradas como reativas ao teste.

3.5. Congelamento de sêmen e armazenamento do plasma seminal

Após a realização das análises prévias, o sêmen foi dividido em tubos Falcon de 15 mL e centrifugado a 600 g por 15 minutos (Figura 1). Logo após a centrifugação, o plasma seminal foi separado em tubos Falcon de 15 mL, identificado de acordo com o jumento e colheita e congelado a -20 °C.

O pélete foi ressuspendido em 2 mL de diluente de congelamento BotuCrio (Botupharma®, Botucatu, Brasil), que contém como crioprotetores glicerol (2%) e dimetilformamida (2%), e foi realizada a determinação da concentração do pélete. Uma vez determinada a concentração, foi adicionada quantidade suficiente de diluidor para que fosse obtida a concentração final de 200 milhões de espermatozoides/mL.



Figura 1 – Plasma seminal (sobrenadante) e pélete após a centrifugação do sêmen a 600 g por 15 minutos. Fonte: Arquivo Pessoal.

O sêmen ressuspendido em diluidor de congelamento foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL que foram seladas com álcool polivinílico. Estas foram resfriadas por 20 minutos a 5 °C em refrigerador (Minitube®) (Figura 2).



Figura 2 – Refrigerador Minitube® utilizado para resfriar as palhetas a 5 °C. Fonte: Arquivo Pessoal.

Após a fase de resfriamento as palhetas foram colocadas em contato com vapor de nitrogênio líquido, onde permaneciam distribuídos uniformemente em uma superfície 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido. Estas permaneceram por 20 minutos no vapor de nitrogênio líquido e posteriormente foram mergulhadas em nitrogênio líquido e estocadas em botijão criogênico a uma temperatura de -196 °C.

3.6. Descongelamento de sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos e o conteúdo depositado em tubos plásticos Eppendorf® de 2 mL previamente aquecidos a 37 °C. Um pool de 4 palhetas da mesma partida foi armazenado em banho-maria para realização da diluição do crioprotetor de acordo com cada tratamento descrito no delineamento experimental.

3.7. Avaliação computadorizada de cinética espermática (CASA)

A análise de cinética espermática foi realizada no laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, na fazenda modelo situada em Pedro Leopoldo – MG. Foi utilizado aparelho modelo Sperm Class Analyzer (SCA - Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha), cujos parâmetros para calibração do sistema (setup) estão descritos nos Anexos.

Uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi depositada entre lâmina e lamínula de vidro previamente aquecidas a 37 °C e foram realizadas captura das imagens de 5 campos aleatórios e homogêneos (Figura 3).

Os parâmetros analisados foram: motilidade total (MOT, %), motilidade progressiva (PMOT, %), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm) e frequência de batimento flagelar (BCF, Hz).

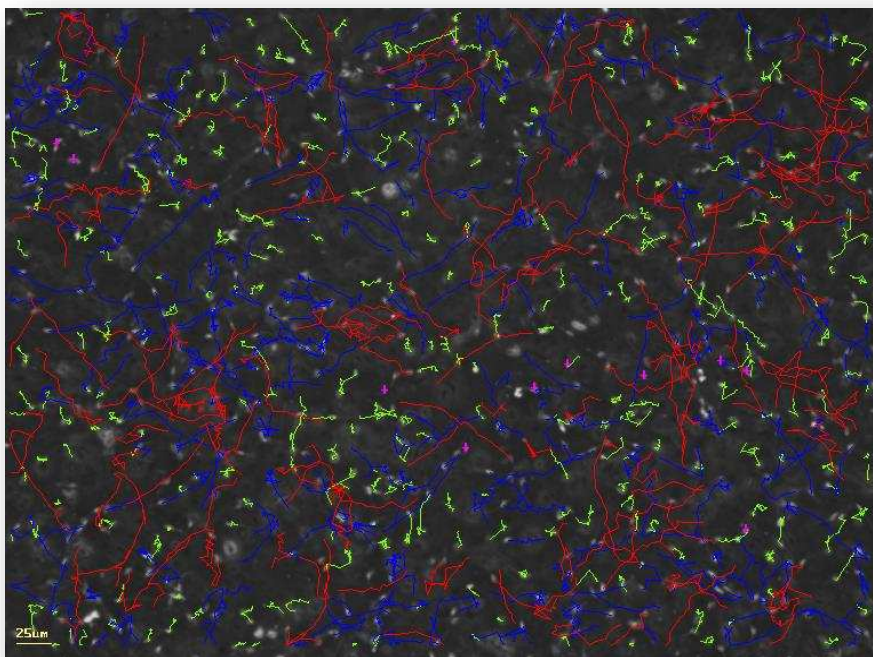


Figura 3 – Imagem de cinética espermática fornecida pelo *Sperm Class Analyzer* (SCA - Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha).

3.8. Citometria de fluxo

As análises espermáticas por meio de citometria de fluxo foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

Foi utilizado o aparelho FACSVerse™ Flow Citometer (Beckton-Dickeson®, SunnyVale, CA, USA), equipado com laser de argônio (azul – 488 nm de emissão com 20 mW de potência), laser UV (vermelho – 640 nm de emissão com 40 mW de potência) e filtros A (Long Pass 507 nm / Band Pass 527/32 nm), B (LP 560 nm / BP 568/42 nm), C (LP 665 nm / BP 700/54 nm), D (LP 752 nm / BP 783/56 nm), E (LP 660 nm / BP 660/10 nm) e F (LP 752 nm / BP 783/56 nm).

Para ajuste do aparelho foram utilizadas amostras de sêmen descongelado de jumentos com fertilidade comprovada, que foram diluídas em PBS para a concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL. Os debris foram eliminados assim como partículas com características de dispersão semelhantes aos

espermatozoides, mas sem conteúdo suficiente de DNA. Utilizou-se 10.000 células por amostra.

As amostras foram previamente analisadas sem corantes, para que assim fosse determinado o local específico onde se localizava a população espermática, sendo este estipulado como padrão para análise. Em seguida, as amostras foram coradas com as sondas de forma a identificar os espermatozoides marcados. Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados coerentes com a viabilidade previamente conhecida do sêmen utilizado e, com isso, o melhor ajuste (compensação) obtido para cada sonda foi estipulado como padrão.

3.8.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA)

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, uma alíquota de 150 µL da amostra foi diluído em PBS (DMPBS – Flush, Nutricell®, Campinas, SP, Brasil) até atingir a concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL. Esta foi incubada com 10 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL de PBS, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) e 3 µL de Iodeto de Propídio (IP, 0,5 mg/mL de PBS, P-4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) em microtubos plásticos Eppendorf® de 2 mL dispostos em banho maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µL de PBS (DMPBS – Flush, Nutricell®, Campinas, SP, Brasil) e a amostra destinada à leitura no aparelho.

3.8.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1)

A análise do potencial mitocondrial foi determinado de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2010) modificado. Uma alíquota de 500 µL de cada amostra previamente diluída em meio PBS (DMPBS – Flush, Nutricell®, Campinas, SP, Brasil) até atingir a concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL foi incubada com 0,5 µL da sonda JC-1 (153 µM em

DMSO; T4069, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) por 40 minutos em banho-maria a 37 °C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho.

3.8.3. Avaliação da produção de H₂O₂ intracelular (DCFDA/IP)

Para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular, foi seguido protocolo proposto por Macías-García et al. (2012). Uma alíquota de 500 µL da amostra diluída em meio PBS (DMPBS – Flush, Nutricell®, Campinas, SP, Brasil) até atingir a concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL foi adicionada a um microtubo plástico Eppendorf® de 2 mL aquecido em banho maria a 37° C, e corada com 0,5 µL de DCFDA (1 mg/mL de DMSO, 2mM; 35845, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) durante 30 minutos. Após esse período, 150 µL da amostra incubada foi corada com 3 µL de IP, permanecendo incubada por mais 5 minutos. Transcorrido este tempo, foram então adicionados 150 µL de PBS e a amostra foi destinada à leitura pelo aparelho.

3.9. Análise Estatística

As análises do sêmen fresco seguiram um delineamento inteiramente casualizado de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + J_i + e_{ij}$$

Em que: Y_{ij} = resposta observada; μ = constante; J_i = efeito referente ao jumento; e e_{ij} = erro aleatório.

As análises do sêmen descongelado seguiram um delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas (*Split plot*) de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + J_i + R(a)_i + T_j + (JT)_{ij} + R(b)_{ij}$$

Em que: Y_{ij} = resposta observada; μ = constante geral; J_i = efeito referente ao jumento (parcela); $R(a)_i$ = resíduo da parcela (resíduo a); T_j = efeito do

tratamento (subparcela); $(JT)_{ij}$ = interação; $R(b)_{ij}$ = resíduo da subparcela (resíduo b).

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para verificação de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias, respectivamente. Os dados foram avaliados por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

Os dados referentes ao vigor espermático foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis. Os dados de aspecto do sêmen foram arranjados em tabelas de contingência e avaliados pelo teste de Freeman-Halton.

O nível de significância adotado foi $\alpha = 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros seminais e Avaliação computadorizada de cinética espermática (CASA)

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), os valores mínimos de motilidade e vigor recomendados para sêmen fresco destinado ao congelamento são 70 % e 3, respectivamente. Portanto os animais utilizados neste trabalho apresentaram os padrões mínimos exigidos para o processo de congelamento de sêmen conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Médias e erro-padrão das características avaliadas no sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.

Jumento	Motilidade (%)	Vigor (1 – 5)	Volume de sêmen sem gel (mL)	Concentração (sptz x 10 ⁶ /mL)
J1	87,0 ± 3,0	3,8 ± 0,2	57,0 ± 9,2	360,0 ± 73,4
J2	83,0 ± 2,0	3,8 ± 0,2	89,2 ± 18,7	311,0 ± 55,6
J3	82,0 ± 3,7	3,6 ± 0,2	79,2 ± 4,7	331,0 ± 101,4
J4	80,0 ± 3,2	3,2 ± 0,2	57,6 ± 6,8	250,0 ± 71,4
J5	81,0 ± 3,3	3,7 ± 0,2	87,2 ± 15,1	250,0 ± 60,0
Geral	83	3,6	74	300,4

Siglas: J1 – jumento 1; J2 – jumento 2; J3 – jumento 3; J4 – jumento 4; J5 – jumento 5. P>0,05.

Características avaliadas no sêmen fresco sofrem variações entre jumentos, como observado em diversos estudos utilizando diferentes raças de asininos (MIRÓ, *et al.*, 2005; CANISSO, 2008; DORADO, *et al.*, 2013a; DORADO, *et al.*, 2013b). Ao trabalhar com jumentos da raça Pêga, Freitas (2017) obteve valores de motilidade de 86,6 %, concentração de 582 x 10⁶ espermatozoides/mL, volume de sêmen sem gel de 57,6 mL e vigor de 3,8. Já Canisso (2008) obteve valores de motilidade de 84,2 %, concentração de 254,6 x 10⁶ espermatozoides/mL, volume sem gel de 47,3 e vigor de 3,9. Estes valores diferiram entre os estudos mencionados, assim como dos valores verificados para sêmen fresco no presente estudo (Tabela 1).

Nos parâmetros de motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (MOTP) não foi observada diferença ($P>0,05$) entre o tratamento controle e os demais (Tabela 2).

Tabela 2. Média e erro-padrão dos parâmetros de cinética espermática do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga de acordo com o programa *Sperm Class Analyzer* (SCA).

Variáveis	Controle	BS	PS	BS+PS
MOT (%)	60,1 ± 4,8 ^a	55,0 ± 3,7 ^a	60,9 ± 4,2 ^a	61,2 ± 3,5 ^a
MOTP (%)	22,3 ± 2,6 ^a	19,7 ± 1,9 ^a	19,9 ± 2,2 ^a	18,0 ± 2,0 ^a
VCL (µm/s)	46,4 ± 2,3 ^{ab}	53,0 ± 3,1 ^a	43,0 ± 2,2 ^b	44,0 ± 2,5 ^b
VSL (µm/s)	37,3 ± 1,8 ^{ab}	41,8 ± 2,7 ^a	34,2 ± 1,9 ^b	34,7 ± 2,1 ^{ab}
VAP (µm/s)	41,1 ± 2,0 ^{ab}	45,8 ± 2,8 ^a	37,8 ± 2,0 ^b	38,2 ± 2,2 ^{ab}
LIN (%)	80,6 ± 1,0 ^a	78,5 ± 1,2 ^a	78,9 ± 1,2 ^a	78,7 ± 0,9 ^a
STR (%)	90,6 ± 0,8 ^a	90,7 ± 0,7 ^a	90,0 ± 0,7 ^a	90,6 ± 0,5 ^a
ALH (µm)	1,7 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,1 ^a
BCF (Hz)	8,1 ± 0,2 ^b	9,5 ± 0,2 ^a	8,4 ± 0,1 ^b	9,3 ± 0,2 ^a

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($P<0,05$).

Siglas: BS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1); PS – sêmen descongelado diluído em 10% v/v de Plasma Seminal; BS+PS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1) + 10% v/v de Plasma Seminal; MOT (%) – motilidade total; MOTP (%) – motilidade progressiva; VCL (µm/s) – velocidade curvilínea; VSL (µm/s) – velocidade progressiva; VAP (µm/s) – velocidade de trajeto; LIN (%) – linearidade; STR (%) – retilinearidade; ALH (µm) – amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF (Hz) – frequência de batimentos flagelares.

Nos parâmetros de motilidade total (MOT) e motilidade progressiva (MOTP) não foi observada diferença ($P>0,05$) entre o tratamento controle e os demais.

Sabatini *et al.* (2014) também não verificaram diferença ($P>0,05$) nestes parâmetros ao realizarem a diluição pós-descongelamento com plasma seminal (PS) nas concentrações de 5 e 20 % v/v em sêmen congelado de jumentos, obtendo valores de 63,8 e 66,7 % para motilidade total e 49,0 e 51,3% para motilidade progressiva, respectivamente. Em contrapartida, Saragusty *et al.* (2017) observaram melhora da motilidade total após 3 horas de incubação ao adicionarem BotuSêmen® na proporção 1:1 ao sêmen descongelado de jumentos.

Rota *et al.* (2012) obtiveram resultados menores ($P<0,05$) de motilidade total e progressiva ao realizarem a diluição pós-descongelamento com PS (38 e 18 %, respectivamente) quando comparado com a mesma diluição em meio

diluidor comercial à base de leite em pó (50 e 32 %, respectivamente). No entanto, estas diferenças podem ser atribuídas à proporção de diluição utilizada no estudo, que foi de 1 parte de sêmen para 2 de PS. Apesar destes pesquisadores terem obtido valores menores de MOT e MOTP ao realizar a diluição com PS quando comparado ao diluidor à base de leite em pó, no mesmo estudo de Rota *et al.* (2012) o tratamento com PS mostrou resultados de fertilidade em jumentas de 61,5 % (8/13), enquanto o tratamento com diluidor à base de leite em pó resultou em taxa de fertilidade de 23,1 % (3/13) e o grupo controle (sem diluição pós-descongelamento) resultou em 20,0 % (1/5) de taxa de fertilidade.

Foi observada diferença ($P < 0,05$) na variável velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), onde o tratamento BS apresentou valor médio maior do que nos tratamentos PS e BS+PS, que não diferiram entre si ($P > 0,05$). O tratamento controle não apresentou diferença para os demais. Já os parâmetros de velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) apresentaram valores maiores ($P < 0,05$) no grupo BS em relação ao grupo PS (VSL – 41,8 e 34,2 respectivamente; VAP – 45,8 e 37,8, respectivamente). Os tratamentos controle e BS+PS não diferiram entre si ou entre os tratamentos BS e OS ($P > 0,05$).

Rota *et al.* (2012) também obtiveram valores de VAP menores ($P < 0,05$) ao realizar a diluição pós-descongelamento com PS em comparação com esta diluição em meio diluidor comercial à base de leite em pó.

Os valores de velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) para sêmen descongelado rediluído em Plasma Seminal (PS) avaliados por Sabatini *et al.* (2014) foram respectivamente 153, 99,7 e 107,6 para diluição de 5 % (v/v), e 157,7, 101,9 e 110,4 para 20 % (v/v).

Rota *et al.* (2012) também obtiveram valores de VAP de cerca de 80 $\mu\text{m/s}$ para diluição pós-descongelamento em PS e de cerca de 110 $\mu\text{m/s}$ para diluição pós-descongelamento em diluidor comercial à base de leite em pó. No presente estudo, os valores obtidos para estes parâmetros foram consideravelmente menores. Isto pode ser justificado pelo fato de que em

ambos os trabalhos, Rota et al. (2012) e Sabatini et al. (2014), realizaram a diluição do sêmen em diluente sem crioprotetor antes da centrifugação, reduzindo os danos causados aos espermatozoides pelo processo de centrifugação. Entretanto, neste estudo a diluição pré-centrifugação não foi realizada, possibilitando maiores danos aos espermatozoides durante a centrifugação.

Não foi observada diferença ($P>0,05$) entre o tratamento controle e os demais nos parâmetros de linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %). Sendo que os valores de LIN foram consideravelmente maiores aos encontrados por Sabatini *et al.* (2014).

Considerando a característica de amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), os tratamentos controle e PS não apresentaram diferenças entre si ($P>0,05$), no entanto apresentaram valores menores ($P<0,05$) em relação aos tratamentos BS e BS+PS.

A característica de frequência de batimentos flagelares (BCF, Hz) se apresentou de forma semelhante à amplitude de deslocamento lateral de cabeça. Estas características estão relacionadas à ativação da célula espermática, sendo que, a alteração destas variáveis pode indicar uma hiperativação do espermatozoide (MORTIMER, 1997). A hiperativação ocorre naturalmente no espermatozoide quando se encontra nos órgãos reprodutivos da fêmea e é um indicativo do processo de capacitação espermática. Caso essa capacitação ocorra antes da inseminação artificial pode comprometer a longevidade da célula espermática.

Foi observado efeito de interação Jumento x Tratamento na característica de frequência de batimentos flagelares (BCF), nos quais apenas os jumentos 2 e 3 não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P>0,05$). Estes resultados demonstram mais uma vez a variabilidade entre indivíduos de mesma raça.

Tabela 3. Médias e erro-padrão da variável Frequência de Batimentos Flagelares (BCF) de sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga avaliados por meio do programa *Sperm Class Analyzer* (SCA).

Jumento	Controle	BS	PS	BS+PS
1	8,2 ± 0,2 ^{bA}	9,9 ± 0,3 ^{aAB}	8,6 ± 0,1 ^{bA}	9,5 ± 0,2 ^{abAB}
2	8,4 ± 0,1 ^{aA}	9,1 ± 0,3 ^{aB}	8,6 ± 0,3 ^{aA}	9,4 ± 0,2 ^{aAB}
3	7,9 ± 0,3 ^{aA}	8,7 ± 0,3 ^{aB}	7,9 ± 0,2 ^{aA}	8,3 ± 0,3 ^{aB}
4	7,3 ± 0,5 ^{bA}	9,1 ± 0,4 ^{aB}	8,2 ± 0,2 ^{abA}	9,2 ± 0,5 ^{aAB}
5	8,5 ± 0,6 ^{bA}	10,7 ± 0,6 ^{aA}	8,7 ± 0,3 ^{bA}	10,2 ± 0,4 ^{aA}

Diferentes letras minúsculas na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem entre si (P < 0.05).

Siglas: BS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1); PS – sêmen descongelado diluído em 10% v/v de Plasma Seminal; BS+PS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1) + 10% v/v de Plasma Seminal.

4.2. Citometria de Fluxo

Os resultados referentes às análises de integridade de membrana plasmática e acrossomal estão representados na Tabela 4.

Tabela 4. Médias e erro-padrão da porcentagem de categorias de células ALML, ALMI, AIMI e AIML de sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Categorias	Controle	BS	PS	BS+PS
ALML	41,85 ± 3,46 ^c	56,76 ± 3,02 ^{ab}	51,83 ± 3,00 ^b	61,38 ± 3,09 ^a
ALMI	56,02 ± 3,44 ^a	40,83 ± 2,97 ^{bc}	45,90 ± 2,98 ^b	36,17 ± 3,05 ^c
AIMI	2,06 ± 0,18 ^b	2,35 ± 0,24 ^a	2,19 ± 0,19 ^{ab}	2,36 ± 0,23 ^a
AIML	0,07 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,02 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem a P<0,05.

Siglas: BS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1); PS – sêmen descongelado diluído em 10% v/v de Plasma Seminal; BS+PS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1) + 10% v/v de Plasma Seminal; ALML – acrossoma lesionado e membrana plasmática lesada; ALMI – acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra; AIMI – acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra; AIML – acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada.

Houve diferença entre o tratamento controle e os demais tratamentos na variável ALML, sendo que o tratamento controle teve uma porcentagem menor

($P < 0,05$), em relação aos demais. O grupo PS teve uma porcentagem menor de células ALML em relação ao grupo BS+PS. O grupo BS não diferiu entre os grupos PS e BS+OS ($P > 0,05$).

Na variável ALMI, o tratamento controle mostrou uma porcentagem maior ($P < 0,05$) de células em relação aos grupos tratamento. O grupo PS teve uma porcentagem maior de células ALMI em relação ao grupo BS+PS. O grupo BS não diferiu entre os grupos PS e BS+PS.

Também houve diferença entre o tratamento controle e os demais na variável AIMI, sendo o tratamento controle aquele com a menor porcentagem entre eles ($P < 0,05$). Os grupos BS, PS e BS+PS não diferiram entre si ($P > 0,05$).

A variável AIML não mostrou diferença entre o tratamento controle e os demais tratamentos ($P > 0,05$).

Ao estudarem os efeitos deletérios do glicerol sobre espermatozoides equinos e sua remoção abrupta por meio de diluição em meio isosmótico, Ball & Vo (2001) observaram que a retirada do glicerol causou queda significativa no número de células com acrossoma intacto e na integridade da membrana plasmática. Apesar dos autores não terem realizado o congelamento, estes resultados mostram que o glicerol pode, além de ter efeitos deletérios diretos na célula espermática, causar danos indiretos por meio de seu rápido efluxo da célula quando a mesma (carregada com glicerol) é colocada novamente em meio isosmótico.

Além disso, o processo de criopreservação promove a retirada de colesterol da membrana plasmática do espermatozoide. Este processo faz com que a membrana plasmática perca sua estabilidade, se tornando mais fluida. Com isso, durante o congelamento, os fosfolípidos da membrana irão alterar sua conformação, causando um aumento da permeabilidade da membrana plasmática e comprometendo a viabilidade da célula espermática.

O protocolo de congelamento utilizado neste estudo preconizou a realização da centrifugação sem a diluição inicial do sêmen em diluidor

comercial à base de leite em pó, pois houve a necessidade do armazenamento do plasma seminal. Isso pode ter sido um fator favorável para o desencadeamento de mais lesões nas membranas plasmática e acrossomal, visto que, a centrifugação pode induzir a peroxidação dos lipídeos de membrana (PARINAUD *et al.*, 1997).

Apesar de ter havido um aumento do número de células com acrossoma e membrana plasmática íntegros nos tratamentos com relação ao grupo controle, esse aumento não foi tão significativo quanto o aumento na variável ALML, indicando que os tratamentos não foram capazes de evitar a geração de mais danos às membranas plasmática e acrossomal.

De Andrade *et al.* (2011), no entanto, verificaram um aumento da integridade de membranas plasmática e acrossomal ao adicionar 20 % de plasma seminal ao sêmen descongelado.

Houve interação Jumento x Tratamento na variável ALMI, como demonstrado na Tabela 5. Os jumentos 3 e 4 diferiram entre os grupos, e os tratamentos controle e PS apresentaram diferenças entre os jumentos. Estes resultados mostram, mais uma vez, a variabilidade de indivíduos dentro de uma mesma raça.

Tabela 5. Médias de erro-padrão da porcentagem de células com acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra em sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Jumento	Controle	BS	PS	BS+PS
1	42,34 ± 10,51 ^{Ba}	34,84 ± 8,17 ^{Aa}	33,48 ± 6,46 ^{Ba}	30,98 ± 8,52 ^{Aa}
2	42,61 ± 7,98 ^{Ba}	34,65 ± 6,98 ^{Aa}	36,32 ± 6,89 ^{Ba}	33,58 ± 7,80 ^{Aa}
3	66,23 ± 1,31 ^{Aa}	47,32 ± 7,41 ^{Aab}	64,18 ± 0,90 ^{Aa}	36,84 ± 7,63 ^{Ab}
4	68,96 ± 2,68 ^{Aa}	47,19 ± 6,36 ^{Aab}	46,46 ± 1,06 ^{ABb}	37,42 ± 6,07 ^{Ab}
5	59,98 ± 2,97 ^{ABa}	40,18 ± 3,81 ^{Aa}	49,04 ± 5,32 ^{ABa}	42,03 ± 5,75 ^{Aa}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna diferem a $P < 0,05$.

É evidenciado na Tabela 6 que a porcentagem de células com membrana plasmática lesionada sem produção de peróxido de hidrogênio não mostrou diferença entre os grupos controle e tratamentos ($P>0,05$).

Tabela 6. Médias e desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática íntegra ou lesionada e sua produção de peróxido de hidrogênio em sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Grupos	Controle	BS	PS	BS+PS
MLS	0,85 ± 0,32 ^a	0,53 ± 0,25 ^a	0,66 ± 0,29 ^a	0,63 ± 0,20 ^a
MLC	75,28 ± 2,18 ^b	77,96 ± 1,40 ^{ab}	78,99 ± 1,38 ^{ab}	79,07 ± 1,18 ^a
MIC	19,47 ± 2,07 ^a	17,24 ± 0,87 ^{ab}	16,11 ± 1,01 ^{ab}	15,78 ± 0,87 ^b
MIS	4,39 ± 1,01 ^a	4,26 ± 1,05 ^a	4,23 ± 1,14 ^a	4,52 ± 1,05 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem a $P<0,05$.

Siglas: MLS – células com membrana plasmática lesionada sem produção de peróxido de hidrogênio; MLC – células com membrana plasmática lesionada com produção de peróxido de hidrogênio; MIC – células com membrana plasmática íntegra com produção de peróxido de hidrogênio; MIS – células com membrana plasmática íntegra sem produção de peróxido de hidrogênio.

A porcentagem de células com membrana plasmática lesionada sem produção de peróxido de hidrogênio não mostrou diferença entre os grupos controle e tratamentos ($P>0,05$).

Por outro lado, a porcentagem de células com membrana plasmática lesionada com produção de peróxido de hidrogênio foi menor ($P<0,05$) no grupo controle em relação ao grupo BS+PS. Os grupos BS e PS não diferiram estatisticamente entre si ou em relação aos outros grupos.

A porcentagem de células com membrana plasmática íntegra com produção de peróxido de hidrogênio foi maior ($P<0,05$) no grupo controle em relação ao grupo BS+PS. Os grupos BS e PS não diferiram entre si ou entre os grupos controle e BS+PS.

Não houve diferença na porcentagem de células com membrana plasmática íntegra sem a produção de peróxido de hidrogênio ($P>0,05$).

De acordo com Watson (2000) a criopreservação induz à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta produção exacerbada de EROs é favorecida pela retirada do plasma seminal, preconizada em muitos protocolos de congelamento, visto que, o plasma seminal possui enzimas antioxidantes responsáveis pela regulação dos efeitos deletérios causados pelas EROs, como catalase e redutase.

Em baixas quantidades, as EROs são benéficas para o processo de capacitação do espermatozoide e fertilização do ovócito, no entanto o desequilíbrio entre sua produção e degradação faz com que haja aumento excessivo de suas quantidades na célula espermática, causando efeitos adversos sobre a mesma (BAL, 2008). A sensibilidade dos espermatozoides às espécies reativas de oxigênio é devida à quantidade de ácidos graxos poli-insaturados em sua membrana plasmática e à baixa concentração de enzimas antioxidantes no seu citoplasma (AITKEN, 1994). As EROs reagem com os ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática do espermatozoide desencadeando uma peroxidação lipídica, a qual causa perda de permeabilidade da membrana (AITKEN e BACKER, 2002).

O alto número de células com membrana plasmática lesionada com produção de peróxido de hidrogênio obtido neste estudo pode indicar que durante o processo de congelamento houve grande produção de EROs, causando danos às células espermáticas. O que corrobora com os resultados verificados para viabilidade de membranas plasmática e acrossomal, no qual grande parte das células se apresentaram com acrossoma e membrana plasmática lesionados como indicado na Tabela 4.

No entanto, o grupo controle não diferiu dos grupos BS e PS como na avaliação de integridade de membranas plasmática e acrossomal. Apenas o grupo BS+PS apresentou número menor de células com membrana plasmática íntegra com produção de peróxido de hidrogênio em relação ao grupo controle, sugerindo que a associação do diluidor com o plasma seminal não foi eficaz em proteger a membrana dos danos supostamente causados pelas EROs.

Tabela 7. Médias e desvio padrão da porcentagem de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Potencial de membrana mitocondrial	Controle	BS	PS	BS+PS
Alto	41,92 ± 5,79 ^a	38,23 ± 5,96 ^{ab}	36,32 ± 5,68 ^b	36,78 ± 5,39 ^b
Baixo	57,61 ± 5,75 ^b	61,29 ± 5,92 ^{ab}	63,35 ± 5,65 ^a	62,74 ± 5,34 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem a $P < 0,05$.

Siglas: BS – sêmen descongelado diluído em BotuSêmen (1:1); PS – sêmen descongelado diluído em 10% v/v de Plasma Seminal; BS+PS – sêmen descongelado diluído em Botusêmen (1:1) + 10% v/v de Plasma Seminal.

O número de células com alto potencial mitocondrial foi maior ($P < 0,05$) no grupo controle em relação aos grupos PS e BS+PS. O grupo BS não apresentou diferença entre o grupo controle e outros grupos tratamento.

Já as células com baixo potencial mitocondrial, o grupo controle mostrou um número menor de células em relação aos grupos PS e BS+PS. O grupo BS não diferiu entre o grupo controle e os outros grupos tratamento.

Macías Gracia *et al.* (2012) obtiveram uma porcentagem de 36,2 % de células com alto potencial de membrana mitocondrial no sêmen descongelado de equinos. Apesar do presente estudo ter apresentado maiores porcentagens de células com alto potencial mitocondrial, ao realizar a diluição pós-descongelamento com PS e BS+PS essa porcentagem diminuiu.

4.3. Conclusões

- A diluição pós-descongelamento com diluidor comercial à base de leite em pó (1:1), com plasma seminal (10% v/v) e com a associação do diluidor (1:1) com plasma seminal (10% v/v) foi capaz de manter os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva;

- A diluição pós-descongelamento com diluidor comercial à base de leite em pó (1:1), com plasma seminal (10%) e com a associação do diluidor (1:1) com plasma seminal (10% v/v) não foi eficaz em recuperar as membranas plasmática e acrossomal do espermatozoide;
- A diluição pós-descongelamento com diluidor comercial à base de leite em pó (1:1) e com plasma seminal (10% v/v) foi capaz de manter a integridade de membrana em células com produção de peróxido de hidrogênio;
- A diluição pós-descongelamento com a associação entre diluidor comercial à base de leite em pó (1:1) e plasma seminal (10% v/v) não foi capaz de manter a integridade de membrana em células com produção de peróxido de hidrogênio;
- A diluição pós-descongelamento com diluidor comercial à base de leite em pó (1:1) foi eficaz em manter o potencial mitocondrial dos espermatozoides;
- A diluição pós-descongelamento com plasma seminal (10% v/v) e com a associação entre diluidor comercial à base de leite em pó (1:1) e plasma seminal (10% v/v) não foi eficaz em manter o potencial mitocondrial dos espermatozoides.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. Dissertação (Mestrado em Agronomia), 2006, 77p. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.

AMMAN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. (eds.). **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger. p. 769-789, 1993.

AMMAN, R.P.; PICKETT, B. Principles of Cryopreservation and Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 145-151, 2011.

ARRUDA, R.L.; ORROS, I.R.; PASSOS, T.S.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCARI, C.E.S.N. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 168-184, 2010.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: Bowler K, Fuller, B.J. eds. **Temperature and cells**. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd.: 395-406, 1987.

AURICH, J.E.; KÜNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma effects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257-267, 2008.

BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I.K. Catalase activity in equine semen. **Am J Vet Res.** v. 61, p. 1026-1069, 2000.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 1061-1069, 2001.

BARRETO, M.A.P. **Efeito das proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 KDa sobre a congelabilidade do sêmen, reação inflamatória uterina e fertilidade**. Tese (Doutorado em Produção Animal), 2007, 67p. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, 2007.

BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biolog Reprod**, v. 77, p. 120-126, 2007.

BOETA, M.; QUINTERO, L.Z. Utilización de leche descremada ultrapasteurizada como diluyente de sêmen refrigerado de burro, destinado a la inseminación de yeguas. **Veterinaria México**, v. 31, n. 1, p. 67-69, 2000.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D.; SILVA, E.C.; LIMA, A.L. Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 233-239, 2008.

CANISSO I.F.; SOUZA F.A.; ESCOBAR, J.M.O.; CARVALHO, G.R.; MOREL, M.C.D.; SILVA, E.C.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A.L. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). **Ver Inv Vet Perú**, v. 19, p. 113-125, 2008.

CANISSO, I.F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 2008, 211p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; DAVIES MOREL, M.C.G. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga Donkeys (*Eqqus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). **Theriogenology**, v. 73, p. 56-63, 2010.

CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; DAVIS MOREL, M.; KER, P.G.; RODRIGUES, A.L.; SILVA, E.C.; COUTINHO DA SILVA, M.A. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 43, p. 179-183, 2011.

CARVALHO, G.R. **Fertilidade do sêmen equino diluído, resfriado a 20 °C e transportado**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 1992, 87p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1992.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assesment of Plasma, Acrossomal and Mithocondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 488, p. 479-488, 2007.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, 3ª ed. Belo Horizonte. 2013. 104p.

CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; DE AMICIS, I.; CARLUCCIO, A. Characteristics of donkey spermatozoa along the lenght of the epididymis. **Theriogenology**, v. 77, p. 166-173, 2012.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 424-435, 2010.

DE ANDRADE, A.F.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O.F.; MARTINS, S.M.; ALONSO, M.A.; ARRUDA, R.P. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction of Domestic Animals**, v. 46, p. 682-686, 2011.

DORADO, J.; ACHA, D.; GÁLVEZ, M.J.; ORTIZ, I.; CARRASCO, J.J.; DÍAZ, B.; GÓMEZ-ARRONES, V.; CALERO-CARRETERO, R.; HIDALGO, M. Sperm motility patterns in Andalusian donkey (*Equus asinus*) semen: Effects of body weight, age, and semen quality. **Theriogenology**, v. 79, p. 1100-1109, 2013.

DORADO, J.; ACHA, D.; ORTIZ, I.; GÁLVEZ, M.J.; CARRASCO, J.J.; DÍAZ, B.; GÓMEZ-ARRONES, V.; CALERO-CARRETERO, R.; HIDALGO, M.; Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys (*Equus asinus*). **Animal Reproduction Science**, v. 143, p. 64-71, 2013.

FERNANDES, L.S. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e diluição pós-congelamento de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga**. Dissertação (Mestrado em Veterinária), 2012, 63p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

FREITAS, B.W. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), 2015, 116p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

FREITAS, F.V. **O uso do colesterol carregado pela ciclodextrina na viabilidade do espermatozoide criopreservado de jumentos da raça Pêga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 2017, 68p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Barueri: Malone Ltda. cap. 7, p. 97-110, 2004.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-219, 2002.

HANCOCK, J.L. The morfology of boar spermatozoa. **Jounal Reproduction Microscopy Science**, v. 76, p. 84-97, 1957.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAM, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive? **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-28, 1992.

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

JAIN, K.J.; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 1037-1046, 2006.

JØRGENSEN, N.; AUGER, J.; GIWERCMAN, A.; IRVINE, D.S.; JENSEN, T.K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LE BOM, C.; MACDONALD, E.; PEKURI, A.M.; SCHEIKE, T.; SIMONSEN, M.; SUOMINEN, J.; SKAKKEBOEK, N.E.; Semen analysis performed by different laboratory teams: an intervariation study. **Int J Androl.**, v. 20, p. 201-208, 1997.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 1217-1227, 2008.

KEITH, S.L. **Evaluation of cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Dissertação (Mestrado), 1998. Colorado State University, Fort Collins, Colorado Spring, 1998.

MACÍAS GARCÍA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; APARICIO, I.M.; MIRÓ-MORÁN, A.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLAÑOS, J.M.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; BALAO DA SILVA, C.M.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation

and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, p. 1280-1289, 2012.

MANTOVANI, R.; ROTA, A.; FALOMO, M.E.; BAILONI, L.; VINCENTI, L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. **Reprod Nutr Dev**, v. 42, p. 217-226, 2002.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 84, p. 121-133, 2004.

MAYER, D.T.; LASLEY, J.F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing ability of mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 4, p. 261-269, 1945.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysics**, Clifton, v. 17, p. 53-92, 1990.

MIRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1706-1716, 2005.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA, A. effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v. 72, p. 1017-1022, 2009.

MORRELL, J.M.; GEORGAKAS, A.; LUNDEHEIM, N.; NASH, D.; DAVIES MOREL, M.C.G.; JOHANNISSON, A. Effect of heterologous and homologous

seminal plasma on stallion sperm quality. **Theriogenology**, v. 82, p. 176-183, 2014.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction**, v. 3, p. 403-439, 1997.

OLIVEIRA, J.V.; OLIVEIRA, P.V.L.F.; OÑA, C.M.M.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; SILVA, Y.F.R.S.; PAPA, P.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F.O. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. **Theriogenology**, v. 85, p. 1267-1273, 2016.

ORTIZ, I.; DORADO, J.; MORRELL, J.M.; CRESPO, F.; GOSÁLVEZ, J.; GÁLVEZ, M.J.; ACHA, D.; HIDALGO, M. Effect of single-layer centrifugation or washing on frozen-thawed donkey semen quality: Do they have the same effect regardless of the quality of the sample? **Theriogenology**, v. 84, p. 294-300, 2015.

PARINAUD, J. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit®) following ejaculation. **Human Reproduction**, v. 12, p. 243-246, 1997.

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

PEÑA, F.J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MARTIN MUÑOZ, P. New flow cytometry approaches in equine andrology. **Theriogenology**, v. 86, p. 366-372, 2016.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Lea Febiger: Malven, p. 769-785, 1993.

POLGE, C.; SMITH, A.; PARKES, A. Revival of spermatozoa after vitrification na dehydration at low temperature. **Nature**, p. 164-166, 1949.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI, C.; CAMILLO, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v. 78, p. 1846-1854, 2012.

ROTA, A.; SGORBINI, M.; PANZANI, D.; BONELLI, F.; BARAGLI, P.; ILLE, N.; GATTA, D.; SIGHIERI, C.; CASINI, L.; MAGGIORELLI, M.M.; AURICH, C.; CAMILLO, F. Effect of housing system on reproductive behavior and on some endocrinological and seminal parameters of donkey stallions. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-8, 2-17.

ROWE, A.W. Biochemical aspects of cryoprotective agents on freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 3, p. 12-18, 1966.

SABATINI, C.; MARI, G.; MISLEI, B.; LOVE, C.C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Effect of Post-Thaw Addition of Seminal Plasma on Motility, Viability, and Chromatin Integrity of Cryopreserved Donkey Jack (*Equus asinus*) Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 989-994, 2014.

SAMPER, J.C.; ESTRADA, A.J.; MCKINNON, A.O. Insemination with frozen semen. In: SAMPER, J.C.; PYCOK, J.F.; MCKINNON, A.O. (Eds.) **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saint Louis: Elsevier-Saunders, ed. 2007, p. 285-288.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **J Reprod Fertil Suppl.**, v. 44, p. 107-114, 1991.

SARAGUSTY, J.; LEMMA, A.; HILDEBRANDT, T.; GORITZ, F. Follicular size predicts success in artificial insemination with frozen-thawed sperm in donkeys. **Plos One**, v. 12: e0175637, 2017.

SILVA FILHO, J.M. **Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial em éguas**. Tese (Doutorado em Zootecnia), 1994, 402p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1994.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen equino. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v.59, n.1, p.56-64, 2007.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, p. 1056-1055, 2004.

TERRACIANO, P.B.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V.; ARLAS, T.R.; CASTRO, F.; MATTOS, R.C.; PASSOS, E.P.; OBERST, E.R.; LIMA, E.O.C. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1972-1977, 2008.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 50, p. 793-806, 1998.

TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Rumin Res**, v. 92, p. 126-130, 2010.

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

VARNER, D.D.; Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, p. 448-462, 2008.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLEBOIS, E.; Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 22-35, 2009.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p. 115-136, 2005.

WATSON, E. Artificial insemination in horses. British Veterinary Association – **Equine Practice**. February, 54-59, 1995.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the production of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

ANEXOS

ANEXO A

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

1. IODETO DE PROPÍDEO (IP)

Solução Estoque: 25 mg/mL (40 mM)

1 mL de DMSO + 25 mg de IP

Solução Trabalho: 0,5 mg/mL (0,8 mM)

20 µL de solução estoque + 980 µL de PBS

2. FITC-PSA

Solução Estoque: (0,5 mg/mL)

2 mg FITC-PSA + 4 mL de PBS

Solução Trabalho: (100 µg/mL)

2 mg de FITC-PSA + 20 mL de PBS

3. JC-1

Solução Estoque: 153 mM

5 mg de JC-1 + 5 mL de DMSO

Solução Trabalho:

100 µL da Solução Estoque + 900 µL de DMSO

4. DCFDA

Solução Estoque I: (50 mg/mL)

1 g DCFDA + 20 mL de DMSO

Solução Estoque II: (5 mg/mL)

1 mL da solução estoque I + 9 mL de DMSO

Solução Trabalho: (1 mg/mL)

1 mL da solução estoque II + 4 mL de DMSO

ANEXO B

SETUP SISTEMA SCA (Sperm Class Analyzer, Microptic, Barcelona, Espanha)

Características	Ajuste
Número de Imagens Adquiridas.....	25
Taxa de aquisição de imagens (por segundo).....	22
Tamanho mínimo da célula.....	15 μm^2
Valor de corte do VCL para células rápidas.....	>90 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte do VCL para células lentas.....	<15 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR), Limiar.....	>75%
Movimento circular (LIN).....	<50%
Temperatura.....	37 °C