SHIRLEY ANDREA FLOREZ RODRIGUEZ

*Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética,
membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante a
refrigeração do sêmen equino*

São Paulo

2013

SHIRLEY ANDREA FLOREZ RODRIGUEZ

**Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas,
morfologia e cromatina espermáticas durante a refrigeração
do sêmen equino**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestrado em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo: _____
Orientadora

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2758
FMVZ

Florez-Rodriguez, Shirley Andrea

Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante a refrigeração de sêmen equino / Shirley Andrea Florez-Rodriguez. - 2013.

137 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

Coorientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Refrigeração. 2. Diluidores. 3. CASA. 4. Sondas fluorescentes. 5. Sêmen equino.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Alterações da cromatina, estresse oxidativo, motilidade espermática (CASA) e conteúdo de ATP da célula espermática durante o processo de refrigeração com diferentes diluidores", protocolado sob o nº 2749/2012, utilizando 4 (quatro) equídeos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/10/2012.

We certify that the Research "Changes in chromatin, oxidative, sperm motility (CASA) and ATP content of sperm cells during the cooling process with different extenders", protocol number 2749/2012, utilizing 4 (for) equine, under the responsibility Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/17/2012.

São Paulo, 18 de outubro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FLOREZ-RODRIGUEZ, Shirley Andrea.

Título: Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante a refrigeração do sêmen equino.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 28/02/2013

Banca Examinadora

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: aprovada

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Instituição: FMVZ-USP

Julgamento: aprovada

Prof. Dr. Alexandre Rossetto Garcia

Instituição: EMBRAPA – Pecuária Sudeste

Julgamento: aprovada

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho.

A minha **família**, pelo amor, mesmo distantes vocês mantiveram-se sempre ao meu lado.

A minha orientadora Profa. Dra. **Eneiva Carla Carvalho Celeghini**, eu tenho enorme gratidão, por me dar a oportunidade de realizar meu sonho de ser aluna USP, por me orientar no mestrado, por acreditar em mim, pela liberdade e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. **Rubens Paes de Arruda**, pela disponibilidade de sempre, por todos os ensinamentos, a orientação, pelas valiosas conversas e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. **André Furugen** pelo auxílio e ensinamentos na estatística fundamentais para este experimento.

Aos Profs. do Departamento de Reprodução Animal (VRA) com quem tive contato, pela receptividade, ajuda e ensinamentos.

Aos pós-graduandos e amigos:

Maíra, o anjinho, sempre gentil, alegre e colaboradora. Menina muito coragosa, te admiro.

Dani, sempre aconselhando, obrigada pela paciência no convívio e pelos ensinamentos.

Moana, pelos momentos de descontrair, igualmente pela paciência no convívio.

Henrique, pela disposição para ajudar no experimento e a longo do mestrado e pelo convívio.

Roney, pela amizade e pela tão agradável convivência.

Milena, minha irmã de coração, pela cumplicidade e carinho incondicional.

Fernanda, pela dedicação e competência na realização do experimento.

Kleber, pela colaboração inestimável na realização do experimento.

Renata, pelas multiplex atividades no experimento e pela amizade.

Leonardo, pelo companheirismo, e ajuda nas correções.

Priscila, pela alegria que irradia, pela amizade, carinho, disponibilidade de me escutar.

Arnaldo, pelas conversas e momentos de descontrair.

Ticiano, pela gentileza, colaboração, sempre prestes a esclarecer minhas dúvidas.

Guilherme, pela pronta disponibilidade e a ajuda com a análise estatística.

Camila, pela linda amizade e pelo apoio que encontrei nos momentos difíceis.

Robinson, meu amigo querido, obrigada por todo o que você fez por mim.

Carina, minha amiga, um carinho muito especial, saudades.

Bruna e Carol, pela amizade e pelas boas energias que mandaram desde longe.

Roberta, pelo apoio incondicional e calma que me transmitiu nestes momentos de tensão.

A todos os outros pós-graduandos do LFEM, LFER, VNP, e alunos Colombianos da FZEA.

Aos funcionários **Márcio, João, José Maria, Uberley e Valdir** pela ajuda na colheita de sêmen e manejo dos animais.

Às secretárias **Harumi Shiraishi** e supervisora técnica da biblioteca **Elza Faquim**, pela ajuda burocrática e presteza.

Ao secretário, **Clayton D. Costa**, pela presteza de sempre.

Ao Centro de **Biotecnologia e Reprodução Animal**, minha segunda casa.

Ao Programa Estudantes Convênio de Pós-Graduação – PEC-PG, da CAPES/CNPq - Brasil.

E, por fim, a todos aqueles que não mencionei, mas que colaboraram para esta pesquisa e ao longo do mestrado. **Meu eterno agradecimento!!!**

Fica Proibido:

“Fica proibido chorar sem aprender,
levantar-se um dia sem saber o que fazer,
ter medo de suas lembranças.

Fica proibido não sorrir dos problemas,
não lutar pelo que se quer,
abandonar tudo por medo,
não converter em realidade os seus sonhos.

Fica proibido não demonstrar seu amor,
fazer com que alguém pague por teu mau-humor.

Fica proibido deixar os seus amigos,
não tentar compreender o que viveram juntos,
chamá-los somente quando necessita deles.

Fica proibido não ser você mesmo diante das pessoas,
fingir para elas que não te importas,
ser gentil só para que se lembrem de você,
esquecer todos os que te querem.

Fica proibido não fazer as coisas por si mesmo,
não crer em Deus e fazer seu destino,
ter medo da vida e de seus compromissos,
não viver cada dia como se fosse um último suspiro.

Fica proibido sentir saudades de alguém sem se alegrar,
esquecer seus olhos, seu sorriso,
só porque seus caminhos se desconstruíram,
esquecer seu passado e pagá-lo com seu presente.

Fica proibido não tentar compreender as pessoas,
pensar que as vidas delas valem mais que a sua,
não saber que cada um tem seu caminho e sua sorte.

Fica proibido não criar sua história,
não ter um momento para quem necessita de você,
não compreender que o que a vida te dá, também te tira.

Fica proibido não buscar a felicidade,
não viver sua vida com uma atitude positiva,
não pensar que podemos ser melhores,
não sentir que sem você este mundo não seria igual.”

(Tradução de ‘Queda Proibido’ de Pablo Neruda)

RESUMO

FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A. Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante a refrigeração do sêmen equino. [Effects of different extenders on sperm kinetic, membranes, morphology, and chromatin during equine semen cooling]. 2013. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Incrementar a eficiência do processo de refrigeração do sêmen é de grande interesse na reprodução da espécie equina, à medida que a população de equinos cresce, também aumenta a demanda para a comercialização e transporte de sêmen refrigerado. Esse trabalho foi realizado para verificar os efeitos de diferentes diluidores para refrigeração de sêmen equino a 5°C sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante 12 horas de armazenagem. Foram utilizados quatro ejaculados de quatro garanhões de diferentes raças, colhidos em intervalos semanais. Imediatamente após a colheita, o sêmen *in natura* foi avaliado quanto ao movimento espermático utilizando-se o sistema computadorizado de análise espermática (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial, utilizando-se sondas fluorescentes (PI, H342, FITC-PSA e JC-1, por microscopia de epifluorescência), morfologia espermática por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) e desnaturação da cromatina pela coloração de Azul de Toluidina. Logo após as análises, o sêmen foi diluído usando-se três diluidores diferentes: SMT, à base de leite desnatado e meio de Tyrode (adaptado de: PADILLA; FOOTE, 1991), BSAG, diluidor contendo BSA (adaptado de: GIBB et al., 2011) e SMK, à base de leite desnatado (KENNEY et al., 1975; controle), em seguida foi envasado em bisnagas na concentração de 50×10^6 spz/mL e refrigerado a 5°C em caixas BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu-SP), durante um período de 12 horas. O sêmen foi analisado 5 minutos após a diluição (T0), 4 (T4), 8 (T8) e 12 horas (T12) após a refrigeração quanto ao movimento espermático, integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial, morfologia espermática e desnaturação da cromatina. A análise estatística foi realizada empregando-se o programa computacional Statistical Analysis System (SAS inst. Inc.). Para todas as variáveis foi utilizada a análise de variância (ANOVA). Para comparação das médias, foi utilizado o método de Tukey sendo considerado o nível de significância de 5%. Foram observadas interações entre tempo X tratamento para a maioria das características de cinética espermática. Dentre os efeitos encontrados dos diluidores, destaca-se que SMT e SMK foram superiores na preservação das motilidades total e progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos em detrimento ao diluidor BSAG.

Quanto à preservação das membranas o diluidor SMT ($56,6 \pm 18,7\%$) foi significativamente superior ao SMK ($49,6 \pm 18,6\%$), que por sua vez foi superior ao BSAG ($25,8 \pm 14,8\%$) quanto à porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIA). Comportamento semelhante foi observado para o percentual de membrana plasmática e de potencial de membrana mitocondrial. Contrariamente, a membrana acrossomal não foi afetada pela refrigeração do sêmen a 5°C por até 12 horas independente do diluidor. Foi encontrado maior percentual de defeitos totais quando o sêmen foi refrigerado utilizando o diluidor BSAG ($50 \pm 12,4\%$) do que SMT ($42,6 \pm 11,2\%$) e SMK ($41,8 \pm 12,4\%$). Quando se avaliou a cromatina espermática não foram notados efeitos do tempo de refrigeração nem dos diluidores; todavia, ao se comparar com o sêmen *in natura* notou-se um aumento no percentual de espermatozoides com desnaturação intermediária da cromatina após 12 horas de refrigeração a 5°C com o diluidor BSAG. Conclui-se que a refrigeração do sêmen equino a 5°C altera a cinética espermática de forma oscilante entre os diluidores no decorrer do tempo até 12 horas. Os diluidores SMT e o SMK preservam melhor a cinética, integridade de membranas e morfologia espermática do que o diluidor BSAG.

Palavras-chave: Sêmen refrigerado, CASA. sondas fluorescentes. Azul de toluidina, Espermatozoides de garanhão.

ABSTRACT

FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A. **Effects of different extenders on sperm kinetic, membranes, morphology, and chromatin during equine semen cooling.** [Efeitos de diferentes diluidores sobre a cinética, membranas, morfologia e cromatina espermáticas durante a refrigeração do sêmen equino]. 2013. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

To develop the efficiency of cooling semen is the great advantage in the equine reproduction, as according to the equine population to grow up, too increase the demand to market and transport of cooling semen. This experiment was performed to verify the effects of different extenders to equine cooling semen at 5°C on the sperm kinetic, membranes, morphology and chromatin during 12 hours of storage. Were utilized four ejaculates from four stallions of different breeds, collected a week. Immediately after the collection, the *in natura* semen was evaluated as the sperm movement using the Computer-Assisted Semen Analysis (CASA), integrity of plasma and acrossosomal membranes and mitochondrial membrane potential, using the fluorescent probes (PI, H342, FITC-PSA and JC-1, by epifluorescência microscopy), sperm morphology by microscopy of differential interference contrast (DIC) and chromatin denaturation by Toluidine blue. As soon as finished the analyses, the semen was diluted using three different extenders: SMT, skim milk based and Tyrode medium (adapted from PADILLA; FOOTE, 1991), BSAG, extender containing BSA (adapted from GIBB et al., 2011) and SMK, skim milk based (KENNEY et al., 1975; control), following was packed in flasks at 50×10^6 sperm/mL concentration and cooling at 5°C in BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu-SP) box, during 12 hours. The semen was analyzed 5 minutes after dilution (T0), 4 (T4), 8 (T8) and 12 hours (T12) after cooling about sperm movement, plasma and acrossosomal membranes integrity and mitochondrial membrane potential sperm morphology and chromatin denaturation. The statistical analysis was performed using Statistical Analysis System (SAS inst. Inc.) software. To all variables was utilized the analysis of variance (ANOVA). To media comparison was utilized the Tukey method, considering the significant level at 5%. Were observed interactions between times X treatment to majority of sperm kinetic characteristic. Among the found effects of the extenders, it was detached that SMT and SMK were superior to preserve total and progressive motility and percentage of rapid sperm in detriment to BSAG extender. It about the membranes preservation the SMT extender ($56.6 \pm 18.7\%$) was significantly superior to SMK ($49.6 \pm 18.6\%$), which was superior to BSAG ($25.8 \pm 14.8\%$) as percentage of sperm with plasma and acrossosomal membranes integrity and high mitochondrial potential (PIAIA). Behavior similar was observed to the plasma

membrane integrity and potential mitochondrial membrane percentage. Contrary, The acrossomal membrane was not affected by semen cooling at 5°C until 12 hours independently of the extender. It was found major percentage of defect total to cooling semen using BSAG ($50\pm12.4\%$) extender compared to SMT ($42.6\pm11.2\%$) and SMK ($41.8\pm12.4\%$). When evaluated the sperm chromatin were not found effect of the cooling time neither of the extenders; however, when compared to *in natura* semen notice an increase on the percentage of spermatozoa with moderate chromatin denaturation after 12 hours of cooling at 5°C with BSAG extender. It was concluded that the equine semen cooling at 5°C change the sperm kinetic oscillating way among extenders during the time until 12 hours. The SMT and SMK extenders are better to preserve the sperm kinetic, membranes integrity and morphology than BSAG extender.

Keywords: Cooled semen. CASA. Fluorescent probes. Toluidine blue. Sperm stallion.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Composição do leite bovino.....	31
Quadro 2 –	Parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de análises espermático (CASA) Computer-Assisted Sperm Analyses, Pirassununga – 2013.....	45
Quadro 3 –	Animais do Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS) utilizados no experimento, Pirassununga – 2013.....	54
Quadro 4 –	Protocolo de associação de sondas fluorescentes para integridade de membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de mitocôndria, Pirassununga – 2013.....	58
Quadro 5 –	Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1, Pirassununga – 2013.....	59
Quadro 6 –	Fórmula para o cálculo da porcentagem de células com membranas íntegras, segundo a leitura no microscópio de epifluorescência, Pirassununga – 2013	60
Quadro 7 –	Composição dos diluidor para refrigeração de semen (SMT, BSA e SMK), Pirassununga – 2013.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Material e equipamentos para análises de sêmen aquecidos a 37°C no Laboratório de Biotecnologia do sêmen e Andrologia (LBSA) - Pirassununga – 2013.....	55
Figura 2 –	A. Aparelho para análise computadorizada do espermatozoide (CASA), modelo HTM-IVOS; marca Hamilton-Thorne Biosciences (Beverly, MA, USA). B. Câmara de Makler - Pirassununga – 2013.....	56
Figura 3 –	Imagem da tela mostrando o <i>setup</i> do programa Animal Motility do aparelho HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA - Pirassununga – 2013.....	57
Figura 4 –	Técnica de azul de toluidina A. Fixação do esfregaço B. Coloração das lâminas de esfregaço com o de azul de toluidina (AT) - Pirassununga – 2013.....	61
Figura 5 –	Classificação do grau de descondensação da cromatina espermática adaptado de Carretero et al. (2009). A. células com cromatina normal (ATI), B. células com cromatina moderadamente descondensada (ATII), e C. células com cromatina altamente descondensada (ATIII) - Pirassununga – 2013.....	62
Figura 6 –	Gráfico da curva de refrigeração de sêmen equino nas caixas BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) - Pirassununga – 2013...	64
Figura 7 –	Sistema de refrigeração de sêmen equino. Caixas BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) - Pirassununga – 2013.....	65
Figura 8 –	Esquema simplificado do delineamento experimental, apresentando o processamento do sêmen, os tratamentos, a refrigeração do sêmen e os momentos de análises do sêmen - Pirassununga – 2013.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Médias $\pm$ desvios padrão do volume do ejaculado (sem gel), concentração e vigor espermático do sêmen <i>in natura</i> dos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR), Pirassununga – 2013.....	69
Tabela 2 –	Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros da cinética espermática do sêmen equino <i>in natura</i> avaliados pelo CASA, nos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR) - Pirassununga – 2013..	70
Tabela 3 –	Médias $\pm$ desvios padrão das porcentagens da integridade das membranas espermáticas e alterações na morfologia espermática do sêmen <i>in natura</i> dos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR) - Pirassununga – 2013.....	71
Tabela 4 –	Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com alteração da cromatina espermática do sêmen <i>in natura</i> dos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR), Pirassununga – 2013...	72
Tabela 5 –	Médias $\pm$ desvios padrão da Motilidade espermática total (MT, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	73
Tabela 6 –	Médias $\pm$ desvios padrão da Motilidade progressiva (MPROG, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	73
Tabela 7 –	Média $\pm$ desvio padrão da velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	74
Tabela 8 –	Média $\pm$ desvio padrão da Velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	75
Tabela 9 –	Média $\pm$ desvio padrão da Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	75
Tabela 10 –	Média $\pm$ desvio padrão da Amplitude lateral de cabeça espermática (ALH, μm) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	76
Tabela 11 –	Média $\pm$ desvio padrão da frequência de batimento espermático (BCF, Hz) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	77

Tabela 12 –	Média ± desvio padrão da Retilinearidade espermática (STR, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	77
Tabela 13 –	Média ± desvio padrão da Linearidade espermática (LIN, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	78
Tabela 14 –	Média ± desvio padrão de espermatozoides com velocidade rápida (RAP, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	79
Tabela 15 –	Média ± desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática e acrossomal intactas e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	80
Tabela 16 –	Média ± desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática intacta (MPI, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	81
Tabela 17 –	Média ± desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana acrossomal intata (MAI, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	81
Tabela 18 –	Média ± desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com alto potencial mitocondrial (APM, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	82
Tabela 19 –	Médias ± desvios padrão da porcentagem de defeitos maiores (DMA, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	83
Tabela 20 –	Médias ± desvios padrão da porcentagem de defeitos menores (DME, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	86
Tabela 21 –	Médias ± desvios padrão de porcentagem de defeitos de cauda (PCAU %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	85
Tabela 22 –	Médias ± desvios padrão de porcentagem de defeitos de peça intermediária (PPI %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	85

Tabela 23 –	Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de defeitos totais (DT, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	86
Tabela 24 –	Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de espermatozoides com cromatina normalmente condensada (ATI, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	87
Tabela 25 –	Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de espermatozoides com cromatina moderadamente descondensada (ATII, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	88
Tabela 26 –	Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de espermatozoides com cromatina descondensada (ATIII, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013.....	88
Tabela 27 –	Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com Motilidade total (MT%) e Motilidade progressiva (MPRO, %) no sêmen <i>in natura</i> e após 12 horas (T12) de refrigeração utilizando três diluidores, Pirassununga – 2013.....	89
Tabela 28 –	Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com Velocidade de trajeto (VAP), Velocidade progressiva (VSL), e Velocidade curvilínea (VCL), no sêmen <i>in natura</i> e após 12 horas (T12) e utilizando três diluidores para refrigeração, Pirassununga – 2013.....	90
Tabela 29 –	Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com Amplitude lateral da cabeça (ALH); Frequência de batimento flagelar (BCF), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) e espermatozoides rápidos (RAP) no sêmen <i>in natura</i> e no tempo 12 horas (T12) e utilizando três diluidores para refrigeração, Pirassununga – 2013.....	90
Tabela 30 –	Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntata e alto potencial mitocondrial (PIAIA), células com membrana plasmática íntata (MPI), membrana acrossomal íntata (MAI), e alto potencial mitocondrial, no sêmen <i>in natura</i> e após 12 horas (T12) e utilizando três diluidores para refrigeração, Pirassununga – 2013.....	92
Tabela 31 –	Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com alteração morfológica, no sêmen <i>in natura</i> e após 12 horas (T12) de refrigeração a 5° C utilizando três diluidores, Pirassununga – 2013.....	93
Tabela 32 –	Médias $\pm$ desvios padrão da alteração da cromatina espermática (%) para o sêmen <i>in natura</i> e após 12 horas (T12) de refrigeração utilizando três diluidores, Pirassununga – 2013.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
ALH	Amplitude lateral da cabeça
ANOVA	Análise de variância
APM	Alto potencial de mitocôndria espermática
ATP	Adenosinatrifosfato
BCF	Frequência de batimento espermático
BPS	Proteínas do plasma seminal
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis (Análise Computadorizado espermático)
DIC	Contraste de interferência e diferencial
DMA	Defeitos maiores
DME	Defeitos menores
DT	Defeitos totais
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramma
GLM	General Linear Models
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
kDa	Quilodalton
LIN	Linearidade
LPL	Lipoproteínas
MAI	Membrana acrossomal íntegra
mg	Miligrama
MPI	Membrana plasmática íntegra
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPROG	Motilidade progressiva
MPL	Membrana plasmática lesada
MT	Motilidade total
p	Probabilidade (Nível de significância)
pH	Concentração de íons de hidrogênio
PI	Iodeto de propídio
PIAIA	Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial

PIAIB	Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com baixo potencial
PIALA	Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e alto potencial mitocondrial
PIALB	Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial
PLAIA	Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial
PLAIB	Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e baixo potencial mitocondrial
PLALA	Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e alto potencial mitocondrial
PLALB	Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial
PCAB	Patologia da cabeça espermática
PCAU	Patologia da cauda espermática
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
PPI	Patologia de peça intermediária
s	Segundos
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
SP	Plasma seminal
sptz	Espermatozoide
STR	Retilinearidade
TALP	Meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato.
TALP <i>sperm</i>	Meio de Tyrode suplementado com lactato e piruvato e sem adição de CaCl ₂ e NaHCO ₃
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
ua	Unidades arbitrárias
VAP	Velocidade do trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1	SÊMEN REFRIGERADO.....	27
2.1.1	Colheita de sêmen para refrigeração.....	28
2.1.2	Diluidores para refrigeração seminal.....	29
2.1.2.1	Diluidores a base de Leite.....	30
2.1.2.2	Substrato energético.....	32
2.1.2.3	Albumina sérica bovina (BSA).....	33
2.1.3	Efeito do pH do diluidor.....	34
2.1.4	Efeito das condições osmóticas.....	35
2.1.5	Efeito da temperatura e tempo de armazenamento.....	37
2.1.6	Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROS).....	37
2.1.7	Efeito do plasma seminal e a centrifugação.....	39
2.1.8	Efeito da refrigeração sobre a integridade de membranas e potencial de mitocôndria.....	40
2.1.9	Efeitos da refrigeração sobre a estrutura da cromatina.....	41
2.2	ANÁLISES DO SÊMEN EQUINO.....	44
2.2.1	Cinética espermática.....	44
2.2.2	Integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial.....	46
2.2.3	Integridade da cromatina e DNA.....	47
3	HIPÓTESE.....	49
4	OBJETIVOS.....	51
4.1	GERAIS.....	52
4.2	ESPECÍFICOS.....	52
5	MATERIAL E MÉTODO.....	53
5.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	54
5.2	ANIMAIS.....	54
5.3	COLHEITA DO SÊMEN.....	54
5.4	ANÁLISES DO SÊMEN.....	55

5.4.1	Concentração espermática.....	56
5.4.2	Avaliação computadorizada do movimento espermático.....	56
5.4.3	Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.....	64
5.4.4	Morfologia espermática.....	60
5.4.5	Análise da cromatina espermática.....	61
5.5	COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DE DILUIDORES.....	62
5.6	REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN.....	64
5.6.1	Análise do sêmen refrigerado.....	65
5.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	66
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
6	RESULTADOS.....	68
6.1	CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DO SÊMEN <i>IN NATURA</i> DOS GARANHÕES.....	69
6.2	EFEITOS DOS DILUIDORES SOBRE A MOTILIDADE ESPERMÁTICA	72
6.2.1	Motilidade total (MT%).....	72
6.2.2	Motilidade progressiva (MPROG %).....	73
6.2.3	Velocidade de trajeto (VAP).....	74
6.2.4	Velocidade progressiva (VSL).....	74
6.2.5	Velocidade curvilinear (VCL).....	75
6.2.6	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH).....	76
6.2.7	Frequência de batimentos (BCF).....	76
6.2.8	Retilinearidade (STR).....	77
6.2.9	Linearidade (LIN).....	78
6.2.10	Espermatozoides rápidos (RAP %).....	78
6.3	EFEITO DOS DILUIDORES SOBRE A INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS.....	80
6.4	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	82
6.5	INTEGRIDADE DA ESTRUTURA DA CROMATINA.....	86
6.6	EFEITO DA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO A 5° C POR 12 HORAS.....	89
6.6.1	Efeito da refrigeração por 12 horas sobre a cinética espermática.....	89
6.6.2	Efeito da refrigeração por 12 horas sobre a integridade de membranas..	91

6.6.3	Efeito da refrigeração por 12 horas sobre as alterações da morfologia....	92
6.6.4	Efeito da refrigeração por 12 horas sobre a estrutura da cromatina.....	93
7	DISCUSSÃO.....	95
7.1	ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE ESPERMÁTICA (CASA).....	97
7.1.1	Motilidade Total (MT) e Motilidade progressiva (MPROG).....	98
7.1.2	Velocidade progressiva (VSL), Velocidade curvilinear (VCL) e Velocidade de trajeto (VAP).....	101
7.1.3	Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) e linearidade (LIN).....	103
7.1.4	A retilinearidade (STR) e Frequência de batimentos (BCF).....	104
7.1.5	Espermatozoides rápidos.....	105
7.2	ANÁLISES DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	106
7.3	ANÁLISES DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	111
7.4	ANÁLISE DA CROMATINA ESPERMÁTICA.....	113
8	CONCLUSÕES.....	116
	REFERÊNCIAS.....	119
	ANEXOS.....	130

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O uso de sêmen refrigerado na inseminação artificial (IA) de equinos é a modalidade mais aceita pelos veterinários no campo. Graças ao avanço que vem apresentando nas últimas décadas (LOOMIS, 2012), vem sendo utilizado rotineiramente na criação de cavalos desde os anos 80 (HECKENBICHLER et al., 2011). A cada ano o número de éguas inseminadas com espermatozoides produzidos e transportados refrigerados aumenta em passo acelerado, sendo o Brasil o segundo país que mais utiliza esta biotécnica (PAPA et al., 2005). O desenvolvimento foi incrementado a partir do momento que as associações de equinos permitiram a inseminação artificial com sêmen refrigerado e possibilitaram o registro genealógico dos produtos, colocando-se como a ferramenta mais importante na produção equina (SQUIRES, 2009).

A refrigeração do sêmen proporciona longevidade aos espermatozoides fora do trato reprodutivo (BRINSKO; VARNER; BLANCHARD, 2000), tendo como princípio básico a redução do metabolismo celular (WATSON, 1995). A capacidade de preservar a viabilidade dos espermatozoides pela refrigeração oferece muitas vantagens na reprodução equina, no aspecto econômico, saúde reprodutiva e facilidade no transporte de sêmen (BRINSKO; VARNER; BLANCHARD, 2000; SQUIRES, 2009). Ainda, a principal vantagem desta biotécnica é permitir o melhor aproveitamento de animais de grande potencial genético (NUNES; ZÚCCARI; COSTA E SILVA, 2007). Apesar de esta técnica resultar em manutenção da capacidade de fertilização por um período de até 24 a 48 horas a 5°C (MORAN et al., 1992), sua utilização no Brasil está associada ao transporte de sêmen entre haras próximos, sendo utilizado na maioria das vezes em até 12 horas da colheita e processamento do sêmen.

Os espermatozoides são sensíveis a danos mecânicos no decorrer do processo da refrigeração (RAMIRES-NETO et al., 2012). Ainda, o armazenamento de sêmen é associado com uma redução da viabilidade celular. O fator principal é o potencial de susceptibilidade da estrutura do espermatozoide equino ao estresse oxidativo, sendo as membranas plasmáticas são as mais afetadas, devido a sua composição rica em ácidos graxos poli-insaturados que podem ser mais propensos à peroxidação lipídica por ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (KANKOFER et al., 2005). Além do estresse oxidativo, o estresse térmico durante o processamento do sêmen refrigerado pode causar lesões na membrana plasmática e em outros

compartimentos, como o acrossoma, mitocôndrias e possivelmente sobre a estrutura do DNA (LOVE et al., 2002).

No melhoramento genético dos garanhões, a seleção é feita com base nas características de linhagem e desempenho atlético, não levando em consideração o desempenho reprodutivo (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007), como resultado, a capacidade de fertilização é inconstante e às vezes insatisfatória, devido as variações na qualidade do semen entre garanhões e ejaculados do mesmo indivíduo. Técnicas de refrigeração de sêmen equino foram bastante estudadas e continuam sendo pesquisadas, porque há grande interesse em manter o potencial de fertilização por mais tempo e melhorar a eficiência reprodutiva, em que a qualidade seminal assume um efeito considerável (GUAISTI; MONTEIRO; PAPA, 2012).

Diluidores de sêmen têm sido tradicionalmente desenvolvidos para promover a otimização da manutenção da motilidade espermática (LOVE et al., 2005). A preservação do sêmen por muitas horas não é possível sem a adição destes diluidores, os quais são responsáveis por prolongar a vida do espermatozoide. Os diluidores estabilizam sistemas enzimáticos, mantêm a integridade de membranas, protegem os espermatozoides de danos como choque frio, dos efeitos deletérios do plasma seminal, dos produtos tóxicos produzidos pelos próprios espermatozoides, e previnem o crescimento de microrganismos. Além disso, os diluidores aumentam o volume da dose inseminante e possibilitam uma estimativa mais real da motilidade (KATILA, 1997).

O diluidor comumente utilizado é o constituído basicamente de leite em pó desnatado, glicose e antibiótico. Este diluidor mantém as características de motilidade e capacidade fertilizante do espermatozoide equino praticamente inalterado por 24 horas (KENNEY et al., 1975). Entretanto, cada garanhão apresenta uma variação individual ao processo de refrigeração (PADILLA; FOOTE, 1991), dessa forma eles respondem de maneira diferente aos componentes do diluidor, por conseguinte, não há um único melhor diluidor que funcione para todos os garanhões.

O leite é um componente indispensável em diluidores para sêmen equino, é usado principalmente como fonte de proteína, embora o mecanismo de proteção sobre a célula espermática durante o armazenamento não é conhecido (MANJUNATH, 2012). O uso de leite desnatado pode reduzir a eficiência do sêmen quando aplicadas algumas biotécnicas de reprodução assistida (ARTs), devido a que o leite é uma substância biológica com composição complexa, cujos componentes proteicos podem ser tóxicos como a α -lactoglobulina e benéficos como a β -lactoglobulina que protege a membrana espermática (BATELLIER et al., 1997), além que, devido a fato de ser um meio opaco, interfere na

aplicação do laser durante o processo de sexagem de espermatozoides equinos (GIBB et al., 2011). A fonte de proteína tem influencia sobre a motilidade espermatica, segundo Gibb et al. (2011), a albumina serica bovina (BSA) quando adicionada ao diluidor em concentrações de 1% resulta na melhora da motilidade com igual eficiência que o leite desnatado.

Numerosos estudos têm sido realizados para comparar diluidores de composições variadas. Infelizmente, a maioria dos estudos baseia-se em estimativas de motilidade que nem sempre refletem a verdadeira capacidade de fertilização (KATILA, 1997). Fundamentado em pesquisas, Varner (2008), mostrou que a motilidade dos espermatozoides não fornece o poder de discriminação absoluta da qualidade seminal, enfatizando que outros atributos espermáticos desempenham papéis críticos na determinação da capacidade de fecundação dos espermatozoides. A maior dificuldade em definir o potencial de fertilidade do sêmen está no fato de nenhum teste isoladamente ser capaz de medir este potencial de um ejaculado (ARRUDA et al., 2007).

Alterações na arquitetura da membrana e funcionalidade do compartimento espermatico, podem interferir com a capacidade celular e com o processo de fertilização. Estas mudanças podem ser monitoradas utilizando sondas fluorescentes que são capazes de se ligar e corar estruturas específicas da célula que permitem um diagnóstico directo (OLIVEIRA et al., 2013). Celeghini et al. (2007) relataram uma técnica eficiente e de alta repetibilidade para a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal, bem como a função mitocondrial.

A avaliação do DNA somado a parâmetros convencionais de análise seminal, serão indicadores potenciais da fertilidade em equinos (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007). A integridade do DNA espermático é reconhecida como um marcador de qualidade espermática e do potencial de fertilidade (LOVE et al., 2002; MORALES et al., 2007). Porém, a implementação das técnicas para análises da cromatina espermática não está sendo realizada como rotina dos laboratórios de análise de sêmen, em razão de que algumas não são eficazes e têm pouca repetitividade e outras são muito complexas, e requerem equipamentos de alto custo e pessoal bem treinado. Torna-se necessário o desenvolvimento e a utilização de técnicas de avaliação eficientes que permitam estimar a integridade da cromatina, que sejam simples e que possam ser uma ferramenta de avaliação rotineira.

Melhorar o processo de refrigeração de sêmen refrigerado mediante o uso de diluidores com composições diferentes, seguido da avaliação do efeito sobre a célula espermatica a traves de técnicas mais precisas para analisis laboratorial de sêmen equino podem ser uma boa tentativa para incrementar a eficiência reprodutiva no manejo reprodutivo da espécie equina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sucesso da refrigeração do sêmen equino depende da qualidade do sêmen e da capacidade da célula espermática para suportar os desafios a que é submetida, sem apresentar mudanças graves na estrutura e função. Vários fatores influenciam o processo de refrigeração, destaca-se o método de colheita de sêmen, a taxa de diluição, o diluidor, a centrifugação, a taxa de refrigeração, a presença de plasma seminal, o sistema de armazenamento, o tempo e temperatura de estoque, meios de transporte e outros. Estudos vêm sendo realizados desde faz mais de três décadas com revisões importantes, artigos científicos e técnicos de autores como Amman e Pickett (1987); Jasko et al. (1992); Moran et al. (1992); Love e Kenney (1998); Arruda (2000); Rigby et al. (2001); Aurich (2005); Varner (2008); Squires (2009); Arruda et al. (2011), entre outros, que deixaram uma ampla revisão disponível sobre as biotécnicas de reprodução equina. Na presente revisão de literatura serão abordados alguns fatores relacionados ao processo de refrigeração do sêmen equino.

2.1 SÊMEN REFRIGERADO

A refrigeração do sêmen refere-se a uma biotécnica utilizada para aumentar a longevidade de espermatozoides fora do trato reprodutivo, otimizando seu uso e incrementando o número de produtos obtidos por ano de animais de genética superior (BRINSKO; VARNER; BLANCHARD, 2000). O processo de refrigeração representa a interrupção artificial da maturação e fertilização pós-ejaculação, mediante redução da atividade metabólica. O ciclo da refrigeração inclui redução da temperatura, armazenamento e reaquecimento para ser usado posteriormente na IA (WATSON, 1995). O resultado esperado desses processos é a célula espermática com integridade estrutural dos diferentes compartimentos e função semelhante à célula *in natura* (AURICH, 2005), com manutenção da capacidade de fertilização do ovócito por um tempo de até 24 a 48 horas a 5°C (MORAN et al., 1992).

Jasko et al. (1992) relatam que a taxa de gestação obtida com sêmen refrigerado por 24 horas é semelhante à obtida com sêmen fresco, porém, quando este período excede 48 horas,

redução de cerca de 50% pode ser verificada. Entretanto, a fertilidade de um rebanho depende primordialmente da qualidade do sêmen utilizado na IA (LOVE et al., 2005).

Por outro lado, Heckenbichler et al. (2011) afirmam que programas de inseminação artificial (IA) em equinos com sêmen refrigerado apresentam taxas de gestação subótimas, o que se deve principalmente ao uso de sêmen de baixa qualidade e tratamento inapropriadamente para o transporte durante a refrigeração; assim o uso de garanhões de baixa fertilidade é o desafio no manejo reprodutivo de equinos para obter resultados satisfatórios na IA.

A célula espermática é sensível ao processo de refrigeração, o que pode resultar em redução de sua qualidade e viabilidade (RAMIRES-NETO et al., 2012). Muitos fatores afetam a taxa de fertilidade do sêmen refrigerado, incluindo diferenças inerentes não só individual ao garanhão, mas também para o processamento de sêmen e metodologia de refrigeração, bem como o diluente de sêmen utilizado (AURICH, 2008).

A preservação da qualidade do sêmen por um período mais extenso requer um manejo apropriado do sêmen tanto no momento da colheita, manipulação e transporte, como no momento da inseminação (ARRUDA et al., 2009). Entre os requerimentos mínimos para uma IA com sêmen refrigerado encontram-se: a dose inseminante deve conter no mínimo 500×10^6 eptz/mL; a concentração espermática final deve estar entre 25 a 50×10^6 eptz/mL (BRADECAMP, 2011) e a motilidade progressiva deve exceder 35% (HECKENBICHLER et al., 2011). O sêmen pode ser refrigerado até uma temperatura de 4 a 6°C, esta é considerada como a temperatura ótima para a manutenção da motilidade e fertilidade até 24 a 48 horas (JASKO et al., 1992), depois deste tempo a taxa de prenhez diminui drasticamente (HECKENBICHLER et al., 2011).

Além dos requisitos mínimos anteriormente mencionados, na preparação do sêmen para refrigeração é necessário o controle de outros fatores envolvidos que podem interferir na qualidade do sêmen refrigerado. Então, para aumentar o sucesso do uso do sêmen refrigerado devem ser atualizados e padonizados os conceitos inerentes a esta biotecnica.

2.1.1 Colheita de sêmen para refrigeração

O método de colheita influencia a qualidade espermática, sendo, um passo importante para melhorar os resultados do sêmen para refrigeração (SIEME; KATILA; KLUG, 2004).

Fatores como o tempo de estímulo, número de montas e frequência vai alterar a composição do plasma seminal e a concentração espermática. Montas repetidas não só afetam a composição do sêmen, mas incrementam a probabilidade de contaminação com bactérias provenientes da superfície genital, com efeitos negativos na motilidade espermática e perda da integridade de membranas plasmática e acrossomal, reduzindo a qualidade do sêmen (AURICH, 2008). Contaminação bacteriana gera alguns efeitos deletérios sobre a qualidade do sêmen e longevidade, tais como, aglutinação de espermatozoides, diminuição da motilidade e viabilidade (ALTHOUSE, 2008).

O transporte de sêmen refrigerado pode ser um meio eficaz para a propagação de doenças provenientes do sêmen. A falta de higiene nas instalações, equipamentos e com o garanhão no momento da colheita leva a um risco potencial de transmissão de doenças. São comuns patógenos bacterianos que podem ser encontrados na genitália externa e no sêmen de garanhões, exemplo disso são os agentes causadores da pneumonia, tais como a *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus zooepidemicus*, que causam endometrite em éguas (LOOMIS, 2012).

A presença de grande quantidade de bactérias comensais sobre a genitália externa do garanhão pode contaminar o sêmen colhido por vagina artificial, e proliferar em amostras de sêmen diluído. Toda a genitália externa dos garanhões deve ser cuidadosamente lavada antes de colheita com água morna, para reduzir a carga bacteriana e potencial sujidades e detritos comumente encontrados no pênis, na fossa da glândula, divertículo uretral e prepúcio (LOOMIS, 2012). Limpeza e atenção na hora da colheita do sêmen pode ajudar na redução da carga bacteriana proveniente do garanhão (ALTHOUSE, 2008).

2.1.2 Diluidores para refrigeração seminal

Os diluidores de sêmen destinam-se a prolongar a vida fértil do espermatozoide (AMANN; PICKETT, 1987; BRINKO; VARNER; BLANCHARD, 2000). Mediante sistemas de estabilização de enzimas, manutenção da integridade da membrana, proteção das condições ambientais desfavoráveis tais como o choque de frio, os efeitos prejudiciais do plasma seminal, dos produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, do crescimento de microrganismos, também aumenta o volume da dose de inseminação e permitir estimativas confiáveis de motilidade espermática (KATILA, 1997). Por tanto, a utilização de um diluidor

adequado é essencial para a proteção do espermatozoide equino durante sua estocagem (BATELLIER et al., 1997).

Ao longo dos anos, uma grande variedade de diluidores tem sido propostos para refrigeração, armazenamento e transporte de sêmen de garanhões. Açúcares, eletrólitos, buffers, gema de ovo, produtos do leite (BATELLIER et al., 2001), glicerol, albumina de soro bovino (BSA), álcool polivinílico (PVA) e lipossomas são alguns dos compostos que são adicionados a diluentes de sêmen para a proteção de espermatozoides contra mudanças de temperatura (KATILA, 1997).

O diluidor mais comum é o Kenney a base de leite desnatado (KENNEY et al., 1975), outros são à base de glicose e sacarose, contendo frações purificadas de caseína do leite, à base de gema de ovo, meios definidos de caseinatos e proteínas do soro e à base de lecitina de soja (BRADECAMP, 2011).

Meios de diluição e seus componentes protegem a membrana plasmática do espermatozoide contra influências do meio ambiente, mas a composição inadequada deste meio também pode promover danos na membrana. Vantagens recentes na composição do diluidor baseiam-se na substituição de fatores não definidos como gema de ovo ou leite por componentes definidos e mais estáveis (AURICH, 2005).

Uma parte importante do processamento do sêmen para melhorar sua qualidade após a refrigeração e transporte é escolher um diluidor no qual o espermatozoide consiga manter boa motilidade. O efeito positivo natural do leite sobre a longevidade do sêmen não tem sido esclarecido com detalhe. Uma limitação dos diluidores para sêmen a base de leite é o fato que ser um produto biológico, composto por uma variedade de substâncias que não podem ser padronizadas e, portanto, pode variar entre lotes, além disso, só certas frações podem ser necessárias para conseguir os efeitos benéficos sobre a função espermática e, ao contrário, os outros componentes podem ter efeitos deletérios (PAGL et al., 2006; BATELLIER et al., 1997).

2.1.2.1 Diluidores a base de leite

Existem vários diluidores no mercado à base de leite, fundamentados na fórmula original de Kenney et al. (1975), produzem bons resultados na prática, o que difundiu seu uso mundialmente (KATILA, 1997). O leite é eficiente na proteção do espermatozoide equino

durante o processo de refrigeração (BATELLIER et al., 1997), embora o mecanismo pelo qual protege o espermatozoide durante a armazenagem em baixas temperaturas não seja bem entendido (MANJUNATH, 2012).

A composição do leite varia por ser um produto biológico. Fatores como temperatura, estação do ano, estágio de lactação, ordem de lactação no dia, desnate, irregularidades nos aspectos físico-químicos e microbiológicos, condições de produção e sistemas de comercialização, entre outros diversos fatores, afetam as características do leite (ALMEIDA et al., 1999). A composição do leite é basicamente gordura (3,68%), proteínas (3,7%), cinzas (0,70%), extrato seco total (12%), vitamina A (185,49 UI), cálcio (1,30%), fósforo (0,90 % Magnésio (0,10%), Ferro (37 ppm), Zinco (100 ppm) e aminoácidos essenciais (VERRUMA; SALGADO, 1994) dados mais recentes descrevem uma composição similar (Quadro 1).

Quadro 1 – Composição do leite bovino

Componentes principais	Percentual
Água	87%
Sólidos totais	13%
Gordura	3,90%
Proteínas	3,40%
Lactose	4,80%
Minerais	0,80%

Fonte: Venturini; Sarcinelli e Silva (2007)

Um estudo feito por Batellier et al. (1997), testando as frações nativas de fosfocaseinato, beta-caseína, concentrado proteico de soro, alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina, de microfiltrado e ultrafiltrado de leite, conseguiram inferir que, após 48 e 96 horas de armazenagem a 4°C ou a 15°C algumas frações do leite (ultrafiltrado, microfiltrado e fração alfa-lactoalbumina) diminuem a sobrevivência dos espermatozoides, sendo que outras (beta-lactoglobulina e fosfocaseinato nativo) foram protetores.

A lactose pode estar envolvida na proteção do espermatozoide, porém quando usado leite filtrada com lactose e minerais não foi suficiente para proteger o espermatozoide equino durante a estocagem (BATELLIER et al., 1997), afirmando também que os lipídeos não parecem ser o componente responsável pela proteção proporcionada pelo leite.

Micelas de caseína correspondem a 80% da proteína total (MANJUNATH, 2012), entre elas, a alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina (22 e 55%, respectivamente), são as maiores proteínas do leite que interatuam com outras proteínas presentes no plasma seminal. Adicionalmente, as micelas de caseína reduzem a perda de lipídeos da membrana espermática e mantêm sua função preservada durante a estocagem, indicando que a interação das proteínas do plasma seminal e as proteínas do leite poderiam ser a base da proteção espermática (MANJUNATH, 2012).

Os componentes proteicos do leite importantes para a proteção da célula durante a refrigeração são o fosfocaseinato e a β -lactoglobulina, os quais tem a propriedade de manter de maneira mais efetiva a longevidade do sêmen refrigerado a 5°C (PAGL et al., 2006).

Caseínas do leite protegem o espermatozoide durante o armazenamento, interagindo com as proteínas do plasma seminal (BSP), embora com diferentes afinidades (LUSIGNAN et al., 2011). A proteção conferida pelo leite desnatado não envolve a participação de lipídios ou lipoproteínas (LPL), são as micelas de caseína e proteínas do soro do leite que atuam, seja por interação proteína:caseína ou proteína:proteína. Esta associação evita ou minimiza perda de lipídios da membrana espermática, protegendo assim durante o armazenamento do sêmen (MANJUNATH, 2012). Durante o armazenamento do sêmen, as proteínas BSP interagem com caseínas e outras proteínas do leite (α -lactoalbumina e β -lactoglobulina), embora com afinidades diferentes com as proteínas, prevenindo os efeitos deletérios do plasma seminal (LUSIGNAN et al., 2011).

2.1.2.2 Substrato energético

Os açúcares são utilizados como substratos para produção de ATP pelo espermatozoide (KATILA, 1997). Dentre os açúcares utilizados nos meios diluidores estão os açúcares simples como a glicose e frutose, e açúcares não penetrantes na célula, como lactose, rafinose, trealose e piruvato (SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004). Segundo Purdy (2006), a escolha do açúcar a ser incluído no diluidor deve ser baseada na funcionalidade e propriedades químicas.

O piruvato tem sido adicionado ao diluidor como um substrato energético (BRUEMMERT et al., 2002). O piruvato é uma efetiva fonte de energia, uma vez que pode mover-se livremente no citoplasma e entre as mitocôndrias das células. Encontra-se em

grandes concentrações no fluido da tuba uterina e é utilizado como substrato energético pelo espermatozoide (HERENG et al., 2002). É considerado como um agente antioxidante não enzimático presente no plasma seminal a fim de proteger os espermatozoides do dano celular causado pelo estresse oxidativo (GUASTI; MONTEIRO; PAPA, 2012). Atua como um captador de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos sistemas celulares, promovendo proteção contra danos oxidativo, considerado ainda como excelente substrato energético que pode se mover livremente no citoplasma e nas mitocôndrias da célula, por tanto poderia ser incluído como um antioxidante em diluidores para sêmen de equino (UPRETI et al., 1998).

Hereng et al. (2002) estudaram o efeito do piruvato no metabolismo energético de espermatozoides humanos em combinação com a glicose. Eles concluíram que o piruvato exógeno junto a glicose tem a capacidade de ativar a maquinaria para a produção do ATP necessário para manter a motilidade progressiva, a capacitação espermática, a fosforilação do aminoácido tirosina e os processos dependentes de energia pela célula espermática. Estas descobertas indicam que o piruvato exógeno aumenta a produção de ATP, independentemente da respiração mitocondrial, e que o mecanismo é dependente de glicose, assim o piruvato pode promover a fertilidade (HERENG et al., 2002).

Segundo Gonçalves da Silva et al. (2008) esta substancia atua como antioxidante não enzimático. O autor sugere que o piruvato aporta a energia que o espermatozoide necessita para superar o estresse termico. Quando foi adicionado piruvato aos espermatozoides de garanhão a 10 mM, tanto a motilidade quanto a velocidade dos espermatozoides diminui em comparação com os espermatozoides, em um meio controle. No entanto, quando a concentração de piruvato foi reduzida a 2-5 mM, e incubados a 25°C durante 24 horas manteve maiores percentagens de células progressivamente móveis do que as amostras que não continham piruvato (BRUEMMERT et al., 2002).

2.1.2.3 Albumina sérica bovina (BSA)

O BSA tem a capacidade de remover o colesterol da membrana plasmática e aumento da fluidez dessa estrutura, estas mudanças são reconhecidas durante o processo de capacitação. O BSA é usado em meios de capacitação. A inter-relação entre o BSA e a movimentação do colesterol, parece ser importante na regulação da fosforilação da proteína tirosina (VISCONTI; MOORE, 1998).

Padilla e Foote (1991) apontam a importância do BSA no diluidor para sêmen equino como uma alternativa para melhorar a longevidade do sêmen. Suplementando o diluidor de leite desnatado-glicose com um meio de Tyrode modificado, que contém também BSA, manteve a motilidade melhor do que um diluidor só a base de leite desnatado (KATILA, 1997).

Gibb et al. (2011) testaram o BSA como fonte única de proteína no diluidor para sêmen equino, com o objetivo de reduzir a variabilidade biológica e problemas de biossegurança outorgados ao uso do leite, além de obter um diluidor opticamente mais claro e formulado para uso no processo de sexagem de sêmen equino. Segundo os resultados da motilidade, espermatozoides incubados em diluidor a base de leite (SM) e com 1% de BSA (1BSA) foi de 64,9% vs 58% as 0 horas, 47% vs 49,5% aos 45 minutos, e de 40,7 vs 40,5% 90 minutos. Na motilidade progressiva é melhorada quando os espermatozoides foram incubados com BSA (17,8%) quando comparado a sêmen fresco (8,9%).

A presença de concentrações maiores de BSA como fonte de proteína incrementou a integridade do acrossoma nos diluidores testados. Nessa pesquisa foram comparados o diluidor clássico de leite desnatado (SM), e diferentes concentrações de BSA (0,25BSA, 0,5BSA, e 1BSA), encontrando uma população de células com membrana acrossomal intata (MAI) de 65,9%, 64,3%, 66,1% e 67,9%, respectivamente (GIBB et al., 2011).

Nas concentrações de 0,5 e 1%, BSA foi tão eficaz como o leite desnatado em proteger o espermatozoide. Apesar de vários estudos investigaram os mecanismos através dos quais os componentes do leite protegem espermatozoide, um modo definitivo de acção ainda não foi elucidado (GIBB et al., 2011).

2.1.3 Efeito do pH do diluidor

O sêmen *in natura* de garanhão é ligeiramente básico, o valor do pH está entre 7,4 e 7,6 (KATILA, 1997). O pH do sêmen recém-ejaculado está próximo de $7,4 \pm 0,2$, semelhante a outros fluidos orgânicos, e quando o pH é reduzido ao mesmo tempo se reduz o metabolismo energético do espermatozoide e sua motilidade. O metabolismo glicolítico que é desenvolvido pelo espermatozoide, faz com que o pH intracelular diminua e o metabolismo celular quede reduzido. O ácido láctico é o metabolito principal deste processo e tem sido utilizado como um indicador da qualidade do sêmen (RIGAU et al., 1996).

Wendt et al. (2002) avaliaram o comportamento da motilidade espermática do sêmen equino com diluidores apresentando pH 6,4; 6,6; 6,8. 7,0; 7,2; 7,4; 7,6 e 7,8 e refrigerado a 5°C durante 24 horas, não foram detectadas diferenças para a motilidade total, VCL, VAP e ALH, para nenhum dos tratamentos; no entanto, foram verificadas diferenças para os valores de VSL, LIN e STR, sendo mais altos para os tratamentos com pH entre 6,4 e 6,8 comparado ao pH na faixa de 7,4 a 7,8.

Foi sugerido pelo mesmo autor que a faixa para o pH do diluidor deve estar entre 6,6 e 7,2 para otimizar a motilidade espermática, enquanto previne motilidade característica da capacitação, e conclui que é possível modular o processo de capacitação com o ajuste do pH do meio diluidor para armazenamento do sêmen equino. Tem sido relatado também que o incremento no pH está implicado com lesões de acrossoma. Embora, estudos sejam limitados, presumivelmente o pH influencia na viabilidade espermática, de tal maneira, que o controle do pH do diluidor otimiza a longevidade da motilidade do sêmen sob condições de estoque (WENDT et al., 2002).

2.1.4 Efeito das condições osmóticas

O estresse osmótico induz mudanças no volume celular resultado do movimento de água e solutos através da membrana plasmática (BALL, 2008). A resposta ao estresse osmótico é dependente da permeabilidade da membrana plasmática para a água e para os componentes do diluidor, sendo influenciada pela temperatura (HOFFMANN et al., 2011). A capacidade do espermatozoide de regular o volume celular em condições isotônicas, hiposmóticas ou hiperosmóticas (75 a 900 mOsm kg⁻¹), é importante para a subsequente viabilidade e preservação da função espermática. Efeitos adversos têm sido encontrados na motilidade, viabilidade, integridade de membranas espermáticas e no metabolismo (BALL; VO, 2001).

Os ganhões com sêmen de baixa qualidade apresentam menos tolerância osmótica comparado com os de qualidade seminal superior (HOFFMANN et al., 2011). Porém a resistência ao choque osmótico é maior no espermatozoide de equino, que em outras espécies (POMMER; RUTLLANT; MEYERS, 2002). O espermatozoide de equino exibe uma tolerância osmótica semelhante ao espermatozoide humano e de rato (GLAZAR et al., 2009).

Durante a diminuição da temperatura, as células são expostas a incremento na concentração da solução, levando a um ambiente hipertônico com perda de água, este mecanismo é dependente da taxa de refrigeração utilizada (MORRIS et al., 2007). Embora as vias de regulação da resposta celular ao estresse osmótico em espermatozoides não tem sido definido, foi relatado que o estresse osmótico incrementa produção de ânion superóxido (O_2°), altera a fosforilação da proteína tirosina e está envolvido também com a ativação de outras vias de sinalização, ativação da proteína quinase C, e MAP quinase (BURNAUGH et al., 2010). No entanto, Ball e Vo (2001) sugeriram que o espermatozoide equino é mais sensível a danos osmóticos induzidos pela diluição durante o processo de criopreservação que durante o processo de refrigeração.

2.1.5 Efeito da temperatura e tempo de armazenamento

O estresse térmico ou choque frio tradicionalmente refere-se à sensibilidade peculiar exibida pelos espermatozoides ao resfriamento repentino, ao efeito da gravidade é dependente da taxa de refrigeração, intervalo e faixa de temperatura (WATSON, 1995). Acredita-se que o choque frio possa causar alterações irreversíveis que podem estar associadas com danos às membranas espermáticas principalmente. A célula que passou por este choque causado pelo frio frequentemente move-se em um padrão circular ou de modo retrógrado (ARRUDA et al., 2009). A sensibilidade ao choque frio também varia consideravelmente entre garanhões e mesmo entre ejaculados. Em alguns animais, a fertilidade do sêmen refrigerado por 24 horas pode reduzir a ponto de inviabilizar seu uso para transporte, sendo então recomendada, nestes casos, a inseminação logo após a colheita (AURICH, 2005). Devido a isto, a curva de refrigeração deve ser controlada no processamento do sêmen.

Pesquisas anteriores tem estabelecido que o sêmen pode ser refrigerado rapidamente (-0,7°C/min) de 24 a 19°C. e deve ser lenta (-0,05°C/min) entre 19 e 8°C. Abaixo de 8°C a refrigeração pode ser rápida até a temperatura de armazenamento entre 4 e 6°C (MORAN et al., 1992).

A temperatura muda o metabolismo do espermatozoide, sendo que a 21°C é de 10% a 20% do metabolismo inicial a 37°C, enquanto que a 4°C é apenas de 2 a 7%. A via metabólica a 37°C, assim como, a 15°C é aeróbia, já, a 4°C a via de metabolização é anaeróbia (VIDAMENT et al., 2000).

Os lipídeos da membrana espermática estão em fase líquida a 22°C e em gel a 4°C, ou seja, com a redução da temperatura os lipídeos da membrana passam de um estado fluído, no qual as cadeias de ácidos graxos são relativamente desorganizadas, para um estado de gel, em que as cadeias dos ácidos graxos são rígidas e paralelas, esta mudança acarreta danos à célula espermática (GLAZAR et al., 2009). Este evento é chamado de fase de transição lipídica e ocorre em uma temperatura específica para cada tipo de lipídeo. Em equinos, a fase de transição dos fosfolipídios ocorre por volta dos 20,7°C (PARKS; LYNCH, 1992).

Existem ainda controvérsias sobre a temperatura ideal para armazenamento do sêmen refrigerado. Normalmente é mantido a uma temperatura de 4-6°C. Isto foi determinado como a faixa ótima de temperatura de armazenamento para manter tanto a motilidade, como a fertilidade (MORAN et al., 1992). Entretanto, a motilidade do espermatozoide armazenado a temperaturas constantes, variando de 4 a 25°C, pode ser mantida por períodos curtos na maioria dos diluidores (VIDAMENT et al., 2012). Embora, os resultados podem ser inconstantes devido ao efeito do ganhão.

O sistema utilizado para manter amostras de sêmen em 15°C evita a fase de transição de fosfolipídios da membrana plasmática, e a mudança do estado fluído para o estado de gel, uma vez que a transição ocorre apenas a temperaturas inferiores a esta (FREITAS-DELL'AQUA et al., 2012). Igualmente, Batellier et al. (2001) reportam que o armazenamento a 15°C pode prevenir os danos à membrana plasmática causados pelo choque frio, principalmente para o sêmen de ganhões que não respondem bem a refrigeração. Todavia, recomenda-se o uso da refrigeração a 15°C quando o sêmen for utilizado para IA na propriedade e a 4°C quando for necessário transportá-lo. No entanto, Batellier et al. (1997) testando diferentes frações do leite na longevidade do sêmen equino, encontraram que diluidores a base de leite são mais eficientes quando usada a temperatura de refrigeração de 4°C em comparação a 15°C.

2.1.6 Efeito das espécies reativas de oxigênio (EROS)

O estresse oxidativo é um componente bem definido de muitos processos fisiológicos e patológicos, que pode ocorrer como consequência do metabolismo oxidativo normal ou pode ser resultado de mecanismos específicos dentro de tipos específicos de células (BALL, 2008). O termo espécies reativas de oxigênio (EROs) cobre uma ampla variedade de metabólitos

derivados da redução do oxigênio molecular, incluindo dois mecanismos independentes em espermatozoides mamíferos. A primeira envolve um sistema enzimático localizado na membrana espermática que utiliza NADPH como substrato, e a segunda é a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (SILVA; GUERRA, 2011).

Os espermatozoides, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produzem EROs, sendo a maior parte originada da atividade metabólica normal, quando produzidos em baixas concentrações, as espécies reativas de oxigênio sinalizam eventos celulares e regulam funções fisiológicas (FLAHERTY et al., 2006). Dentre as EROs formadas, podemos citar o anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$), hidroperóxil ($HO_2^{\bullet}$), peroxil ($ROO^{\bullet}$) e alcóxil ($RO^{\bullet}$), e ainda o ácido hipocloroso ($HOCl$) (LAMIRANDE et al., 1997).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de EROs, que ao ter contato com os ácidos decosaheptaenóicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido docosaheptaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões da membrana plasmática, com perda de fluidez e de sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e, por fim, perda da sua função de fertilização (AITKEN; KRAUSZ, 2001). Equilíbrio redox do ambiente parece ser essencial para manter bons parâmetros espermáticos (WNUK et al., 2010).

Em sêmen de garanhões, EROs são geradas principalmente por espermatozoides danificados e por meio da contaminação de leucócitos. Os espermatozoides são potencialmente suscetíveis a danos causados pelo excesso de EROs devido à sua elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e fosfolipídios na membrana e pouco no citoplasma. Sistemas de antioxidantes controlam o equilíbrio entre a produção e a neutralização de EROs e protegem espermatozoides contra danos peroxidativos (KANKOFER et al., 2005).

A peroxidação lipídica aparentemente não é um fator principal que influencia a viabilidade do sêmen durante o armazenamento a 5°C. Este relato está baseado em um estudo feito por Kankofer et al. (2005), no qual não houve aumento de produtos de peroxidação lipídica quando o sêmen foi armazenado a 5°C. Demonstrando que o excesso de EROS gera diminuição da motilidade do espermatozoide, mas sem aumentar a peroxidação lipídica. Assim, a peroxidação lipídica pode ser mais um problema no sêmen congelado do que no sêmen refrigerado (KANKOFER et al., 2005).

Segundo Aurich et al. (2005), a peroxidação lipídica leve promove a capacitação espermática, e um excesso de EROs danifica a membrana plasmática e resulta em perda da motilidade e fertilidade.

2.1.7 Efeito do plasma seminal e a centrifugação

O plasma seminal (PS) é uma mistura de fluido secretado a partir dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias e está envolvido numa grande variedade de funções do espermatozoide e aos eventos que antecedem a fertilização. Embora os dados sobre as características dos vários componentes bioquímicos do plasma seminal tenham sido publicados e tem apresentado progressos, especialmente no campo da proteômica, o papel fisiológico do plasma ainda não é totalmente compreendido (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

Componentes do plasma seminal são importantes para o desenvolvimento e maturidade do espermatozoide no trato reprodutivo do garanhão, além de ter um papel ativo no trato reprodutivo da fêmea, pela ação de seus componentes (hormônios, enzimas, proteínas, lipídios e outros metabolitos) (TROEDSSON et al., 2005). O efeito protetor do plasma seminal sobre o espermatozoide, o papel no transporte e eliminação de células mortas no trato reprodutivo feminino, além da modulação da resposta inflamatória pós-inseminação artificial ou pós-monta, tem sido comprovado por Troedsson et al. (2005)

O efeito da retirada do plasma seminal está sendo foco de muitas pesquisas, concluindo que a presença do plasma seminal reduz a qualidade e viabilidade do sêmen refrigerado de equinos sensíveis ao processo de refrigeração (ANDRADE et al., 2011; AZIZ; ENBERGS, 2012; RAMIRES-NETO et al., 2012).

Na pesquisa feita por Raphael (2007) foi indicado que a motilidade total e progressiva tiveram melhor manutenção no sêmen centrifugado, assim, a centrifugação (300g/20min) não causa danos na motilidade espermática. No entanto causa efeito negativo das velocidades espermáticas e apresenta uma tendência de encontrar maiores porcentagens de defeitos totais, aumento de gota protoplasmática, caudas enroladas.

Ortega-Ferrusola et al. (2011) sugeriram que a centrifugação usada para remoção do plasma seminal causa efeitos deletérios sobre a membrana plasmática e peroxidação

lipídica por indução de espécies reativas de oxigênio (EROS), pelo fato que o plasma seminal é conhecido por ser uma fonte principal de proteção antioxidante (FERRER et al., 2012).

Igualmente, Kareskoski et al. (2011) observaram que a presença de plasma seminal durante o armazenamento refrigerado causou degradação do DNA, mas a motilidade total e progressiva não foi afetada. Por outro lado, verificou-se que a concentração de 10% de plasma seminal também mantém a motilidade espermática e qualidade do DNA, mesmo sem centrifugação e ressuspensão em extensor fresco (LOVE et al., 2012).

Apesar da aparente necessidade da presença de uma quantidade mínima de plasma seminal (5%) para a manutenção adequada da motilidade no sêmen equino, modificações do diluidor de Kenney ou a remoção do plasma seminal não são usadas rotineiramente para sêmen refrigerado, mas parecem ser úteis no incremento da manutenção da motilidade do espermatozoide de alguns garanhões cujo sêmen apresenta menor resistência ao processo de na refrigeração (ARRUDA et al., 2009).

Os danos durante a estocagem de sêmen refrigerado ou criopreservado é incrementado quando o plasma seminal é removido devido a que a maior capacidade antioxidante do espermatozoide reside nos componentes do plasma seminal. Fatores como albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotina estão presentes no plasma seminal e podem atuar como antioxidantes (BALL, 2008).

Ainda o uso do plasma seminal é bastante controverso, no entanto dentro do contexto, Andrade (2009), sugere que a retirada do plasma seminal é uma das causas da redução da fertilidade, possivelmente porque o plasma seminal exerce um efeito imunomodulador que deve ser aproveitado principalmente quando há necessidade de se realizar inseminações em períodos inferiores há 48 horas.

2.1.8 Efeito da refrigeração sobre a integridade de membranas e potencial mitocondrial

Membrana plasmática de espermatozoides de garanhões tem um relativamente alto teor de colesterol de 37%, sendo, portanto mais propensa ao estresse oxidativo. O processamento do sêmen danifica a membrana plasmática e provocam perda da motilidade e capacidade fertilizante (AURICH, 2005).

Refrigeração do sêmen de 37 a 8°C, especialmente quando utilizadas taxas maiores a 0,3°C/min, resulta em danos específicos da membrana plasmática do espermatozoide como o “choque térmico” ou “injúria do frio”. É caracterizado principalmente por padrões anormais de movimento, perda rápida da motilidade durante o armazenamento, danos da membrana acrossomal, assim como o metabolismo reduzido devido à perda de enzimas e outros componentes intracelulares (MORAN et al., 1992).

Raphael (2007) estudou o efeito da refrigeração a 5°C utilizando diluidor a base de leite desnatado (Botu-semen®, Botupharma, Botucatu-SP) sobre as membranas. Os resultados obtidos da porcentagem de células com membrana plasmática intata, acrossoma intato e alto potencial de mitocôndria (PIAIA) no tempo 0 horas após a diluição foi de 60,5±2,1, 64,8±2,2, 55,7±1,5 e 60,0±3,0. Já para o tempo 24 horas o declínio na porcentagem deste tipo de células não foi significativo, com redução de 1,2%, 8,8%, 15,7% e 2,1% para os quatro ganhões, de maneira similar entre as 24 horas e as 48 horas não houve diferença significativa, no entanto das 48 horas às 72 horas a queda de células PIAIA foi notoriamente reduzida (32,1%, 36,4%, 15,1% e 24,4%). comprovando o efeito gação, e evidenciando que a célula espermática tem maior capacidade de preservação das membranas até 48 horas e apresenta um período crítico de lesão após 48 de refrigerado nas condições de estudo.

2.1.9 Efeitos da refrigeração sobre a estrutura da cromatina

Alterações no complexo DNA-proteína dos espermatozoides de mamíferos vêm sendo sugeridas como importantes causas de subfertilidade em várias espécies (BRANDÃO et al., 2006). A condensação da cromatina durante a espermatogênese e a subsequente descondensação no ovócito durante a fertilização é essencial para o sucesso da transmissão do genoma paterno (DIAS et al., 2006).

Durante a espermiogênese, o núcleo de espermátides sofre alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Sua forma, tamanho e estado de condensação mudam drasticamente, devido à troca de histonas por proteínas de transição e de arginina altamente básica e protaminas ricas em cisteína (DIAS et al., 2006).

O DNA e o RNA consistem em apenas quatro diferentes nucleotídeos. Todos os nucleotídeos tem uma estrutura comum: um grupamento fosfato ligado por uma ligação fosfoester à pentose (uma molécula de açúcar de cinco carbonos), que por sua vez, está ligada

a uma base orgânica. Os ácidos nucleicos são componentes heterocíclicos. O caráter ácido dos nucleotídeos é devido a presença de fosfato, que se dissocia no pH encontrado no interior das células, liberando íons de hidrogênio e deixando o fosfato negativamente carregado. Uma fita única de ácido nucleico é um polímero fosfato-pentose (poliéster) com bases purinas e pirimidinas como grupamentos laterais. As ligações entre os nucleotídeos são chamadas ligações fosfodiester (LOVE, 2005).

Falhas no complexo DNA-proteína podem ser investigadas por biotécnicas mais simples, como por exemplo, a técnica de metacromasia induzida com azul de toluidina (AT). A superioridade do Azul de toluidina em relação à Laranja de acridina sugere que esta coloração é mais sensível para identificar as alterações no complexo DNA-proteína em espermatozoides de equinos, pela determinação da quantidade de grupos fosfato livres (NAVES et al., 2004).

O azul de toluidina interage ionicamente com os fosfatos de cadeias de DNA descondensadas de espermatozoides imaturos e maduros, não sendo possível diferenciar entre alterações produto do método de conservação do sêmen e alterações com origem na espermatogênese. Quando distúrbios da cromatina ocorrem durante a espermatogênese as histonas persistem e podem ser evidenciadas com a coloração de aniline blue (CARRETERO et al., 2011). Os componentes da cromatina espermática, mais susceptível a danos ao DNA, são os segmentos ligados às histonas e as regiões aderidas à matriz (MARs) que são também regiões ligadas a protaminas (VILLAMIL et al., 2012).

Os reprodutores que exibem elevado número de células com DNA comprometido em amostras frescas, também mostram um declínio acelerado na qualidade do DNA espermático e quando refrigerado ou armazenado a longo tempo (LOVE, 2005).

A presença de plasma seminal durante a refrigeração causa degradação do DNA, mas não altera a motilidade total e progressiva dos espermatozoides. A porção rica em espermatozoides armazenada sem plasma seminal (centrifugação $4000 \times g$, 15 min) mantém alta porcentagem de integridade do DNA (KARESKOSKI et al., 2011).

Love et al. (2002) demonstraram que a desnaturação do DNA espermático a diferentes taxas depende da temperatura de estocagem e afetam a fertilidade do garanhão. A 5°C em diluidor a base de leite desnatado não foi observada mudança na taxa de DNA espermático desnaturado até 48 horas. Por outro lado, o sêmen armazenado a 20°C mostrou moderado nível de espermatozoides desnaturados e a 37°C mostrou um alto nível de desnaturação. Tem sido reportado que extensores à base de leite reduzem a qualidade da cromatina quando comparado com outros diluidores, por exemplo, aqueles à base de gema de ovo. Os resultados

sugerem que equinos férteis não tem diminuição da qualidade da cromatina quando o sêmen é armazenado a 5°C, embora alguns equinos subférteis apresentam declínio na qualidade da cromatina. Ademais o DNA desnatura rapidamente depois de 20 a 30 horas, sugerindo uma sensibilidade do DNA espermático ao ambiente de estresse.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é considerada a principal causa da fragmentação do DNA espermático. Excessiva produção intrínseca de EROs pode resultar da presença de espermatozoides imaturos com retenção gotas citoplasmáticas (TAMBURRINO et al., 2012).

Love et al. (2005) estudaram a influência do plasma seminal e do tipo de extensor sobre a integridade do DNA, os achados foram que o sêmen equino após 24 e 48 horas de armazenamento refrigerado, com remoção completa do plasma seminal (independentemente do tipo extensor) proporcionou maior proteção à estrutura do DNA espermático. Além disso, o dano ao DNA incrementa com o aumento da concentração de plasma seminal, sugerindo por si que só o plasma seminal contém fatores prejudiciais ao DNA espermático. Embora, tem sido demonstrado que o plasma seminal tem propriedades antioxidantes que protegem o DNA de degradação, mesmo quando a exposição do espermatozoide ao plasma seminal é apenas de por pouco tempo.

Equinos com baixa fertilidade e com uma porcentagem de danos ao DNA entre 15 e 30% resultam em maior declínio da fertilidade. Foi demonstrado que uma redução na integridade do DNA pode ocorrer apesar da manutenção da motilidade dos espermatozoides, o que poderia explicar porque alguns garanhões apresentam redução da fertilidade do sêmen refrigerado e armazenado quando a motilidade espermática é ainda mantida (LOVE, 2005).

No sêmen refrigerado e armazenado no Equitainer, o dano ao DNA espermático teve um incremento linear. O índice de espermatozoides fragmentados, avaliados pela técnica cometa, 48 horas depois de refrigerado a 5°C em comparação com o sêmen fresco foi de $63 \pm 13,9\%$ e $28 \pm 15,6\%$, respectivamente (LINFOR; MEYERS, 2002).

De acordo com os dados apresentados por Freitas-Dell'Aqua et al. (2012), no sêmen equino refrigerado não houve diferenças significativas no índice de fragmentação do DNA, associadas com até 24 horas de armazenamento, independente da temperatura de refrigeração (5°C e 15°C).

2.2 ANÁLISES DO SÊMEN EQUINO

A importância da avaliação do sêmen no garanhão e das características do sêmen foi documentado por Day em 1940. Muitas características do espermatozoide estão associadas com a fertilidade, incluindo a motilidade, as características morfológicas e função do acrossoma. No garanhão, fertilidade tem sido associada com a morfologia dos espermatozoides e a motilidade dos espermatozoides (LOVE; KENNEY, 1998).

Porém, tentativas de relacionar de forma consistente e fortemente a fertilidade com parâmetros seminais específicos no garanhão são de capacidade limitada (LOVE et al., 2000). Atualmente, sabe-se que as análises das características seminais assume um papel decisivo na determinação da fertilidade do garanhão, particularmente na sua eficiência reprodutiva. A capacidade de prever a fertilidade futura é muito melhorada sempre que vários testes sejam utilizados em combinação, ou se incorporem algumas técnicas mais recentemente desenvolvidas, além de análises de múltiplas amostras (VARNER, 2008).

Da mesma maneira, Celeghini et al. (2007) descrevem que a manutenção do potencial de fertilização do espermatozoide depende da integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares, o que na prática, reflete na dificuldade de desenvolver um teste laboratorial isolado para prever com exatidão o potencial de fertilidade do sêmen.

2.2.1 Cinética Espermática

A motilidade é avaliada subjetivamente por um observador ou por métodos computadorizados. A motilidade subjetiva é uma ferramenta usada para determinar a qualidade de sêmen. Este método é subjetivo por natureza e, consequentemente, foram desenvolvidos métodos de análises computadorizado da motilidade espermática (CASA, Computer-Assisted Sperm Analyses) para avaliação mais objetiva de análise de imagem convencional ou contagem de partículas (TEJERINA et al., 2008). Com o sistema computadorizado, podem-se obter mais informações sobre a função espermática e fertilidade através da análise de parâmetros adicionais da motilidade espermática, podendo determinar hiperactivação e potencial de fertilização (DAVIS; KATZ, 1993). Atualmente a maioria das pesquisas com sêmen envolve o uso do método computadorizado de análises da motilidade,

no entanto, devido ao custo do equipamento, o uso para análises de rotina tem sido restrito. Fatores como o volume, a concentração da amostra, diluente utilizado, patologias seminais, iluminação do microscópio, temperatura de análise, e os valores do *setup*, são os principais fatores que afetam os resultados do CASA (VERSTEGEN et al., 2002).

O equipamento CASA difere grandemente entre outros equipamentos, com base na óptica e o software usado para a identificação e reconstrução da trajetória espermática. No sistema, é selecionado a taxa de frames de aquisição (número de frames/s analisados), entre 15, 30 ou 60 Hz e pode selecionar o número de frames analisados a partir do qual uma célula espermática será rastreada com sucesso para a sua inclusão na análise de movimento (VERSTEGEN, 2001). Os principais fatores que afetam a motilidade avaliado pelo CASA estão, a temperatura do sêmen, o volume analisado, o tipo de câmera utilizada, a concentração da amostra, o diluidor utilizado, os valores do *setup* (VERSTEGEN et al., 2002).

Os parâmetros gerados pelo sistema CASA mais utilizados, foram descritos por Arruda (2000) (Quadro 2).

Quadro 2 – Parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de análises espermático (CASA) Computer-Assisted Sperm Analyses - Pirassununga – 2013

Parâmetro	Sigla	Descrição
Motilidade Total (%)	MT	Total de células móveis na amostra
Motilidade Progressiva (%)	MPROG	É o número de células movendo-se com $VAP > MVV^1$ e Retilinearidade $STR > So$.
Velocidade Curvilinear ($\mu\text{m/s}$)	VCL	É a velocidade média de cada ponto atual do trajeto seguido por cada célula
Velocidade Progressiva ($\mu\text{m/s}$)	VSL	É a velocidade média percorrida em linha reta entre o início e o final do percurso
Velocidade de Trajeto ($\mu\text{m/s}$)	VAP	É a velocidade média ininterrupta do caminhar da célula
Linearidade (%)	LIN	É o valor médio da proporção entre VSL/VCL .
Retilinearidade (%)	STR	É o valor médio da proporção entre VSL/VAP .
Frequência de Batimentos (Hz)	BCF	Frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido.
Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (μm)	ALH	É a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move.

¹MVV: corte médio de VAP

Fonte: Arruda (2000)

2.2.2 Integridade das Membranas Plasmática, Acrossomal e Função Mitocondrial

A funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos tem sido monitorada por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente conhecidos como sondas fluorescentes. Estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, diferindo assim dos corantes, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas. Atualmente uma variedade muito grande de sondas fluorescentes tem sido usada isoladamente ou em associações em andrologia; pois a combinação de várias sondas fluorescentes possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente (ARRUDA et al., 2011).

Os efeitos da refrigeração do sêmen sobre as membranas da célula espermática podem ser avaliados por associações de sondas fluorescentes, tais como o iodeto de propídeo (PI), Hoechst 33342 (H342), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocinato de fluoresceína (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), para leitura no microscópio de epifluorescência ou citometria de fluxo, embora esta última seja mais apurada, o custo elevado torna ela pouco acessível para a maioria dos laboratórios de análises de sêmen. No entanto, a microscopia de epifluorescência é mais acessível e permite a avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (CELEGHINI et al., 2010).

O iodeto de propídio (PI) é uma sonda fluorescente utilizada para avaliar a integridade da membrana plasmática, que tem afinidade para DNA e cora o núcleo em vermelho quando a membrana plasmática apresenta-se danificada. O Hoechst 33342 (H342) também apresenta especificidade ao DNA, quando associado a outra sonda de coloração distinta, como o PI por exemplo, atua como um marcador de membrana plasmática intacta emitindo fluorescência azul (CELEGHINI et al., 2007; ARRUDA et al., 2011). A reação acrossômica é um evento exocitótico, com liberação de enzimas (acrosina e hialuronidase) e outras enzimas proteolíticas específicas del acrossoma, com a função de facilitar que o espermatozoide penetre a zona pelúcida e se ligue ao oócito. Embora, a capacitação espermática aconteça normalmente no trato genital da fêmea, pode também acontecer “in vitro”, por complexos mecanismos que estão pobremente entendidos (FLAHERTY et al., 2006).

A aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), oriunda da ervilha, liga-se os glicoconjugados da matriz acrossomal, tendo afinidade para as terminações D-glicosil e resíduos D-manosil de glicoproteínas, ligando-se especificamente ao açúcar D-manosidase encontrado no conteúdo

acrossomal. Esta aglutinina, quando conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossoma espermático em verde amarelado, facilitando a visualização e identificação dos acrossoma lesados, podendo ser aplicado aos espermatozoides de várias espécies (CELEGHINI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010).

O iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1, 1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) é um tipo especial de multímeros de carbocianinas, que tem sido usado como uma medida sensível para detectar mudanças no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides em várias espécies (ANDRADE et al., 2007; CELEGHINI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008). O JC-1 possui a habilidade de diferenciar as mitocôndrias coradas com alto ou baixo potencial de membrana. Na mitocôndria com alto potencial de membrana, o JC-1 emite fluorescência vermelho-alaranjada, enquanto que nas mitocôndrias com baixo potencial de membrana, emite fluorescência verde (CELEGHINI et al., 2007).

Para espermatozoide bovino, a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal, bem como a função mitocondrial pode ser realizada pela associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI et al., 2007). Esta mesma técnica com algumas modificações foi utilizada pelo mesmo grupo de pesquisa para avaliação de espermatozoides equinos (NASCIMENTO et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010).

2.2.3 Integridade da Cromatina e DNA

A cromatina espermática é condensada, insolúvel e altamente organizada para proteger a integridade do material genético durante o transporte do genoma paterno através do trato reprodutivo do macho e da fêmea e garante o desenvolvimento do embrião para expressar corretamente a informação genética. Corantes nucleares para cromatina são sensíveis e simples de usar e, portanto, atraente para uso clínico. Suas bases citoquímicas, no entanto, são bastante complexas. Vários fatores influenciam a coloração de cromatina: 1) A regularidade estrutura de DNA, 2) densidade de empacotamento da cromatina e 3) ligação do DNA às proteínas da cromatina (ERENPREISS et al., 2006).

Entre as técnicas de estudo para avaliar os distúrbios do DNA espermático, e determinar o potencial de fertilidade foram descritos em princípio para espermatozoides humanos: o SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) (EVENSON et al., 1980); o teste de Laranja de acridina (TEJADA et al., 1984), TUNEL (SAILER et al., 1995), Terminal desoxínucleotidil

Uridin trifosfato, *in situ* nick translation (ISNT) por (GORCZYCA et al., 1993), ensaio em gel de eletroforese (COMETA) (ARAVINDAN et al., 1997). Alternativas para avaliar a integridade da cromatina envolvem testes colorimétricos, seja diretamente no espermatozoide com o uso de corantes, tais como azul de toluidina (MELLO, 1982), azul de anilina (AUGER et al., 1990), diff-quick (MOTA et al., 2006), CMA3 (chromomycin A3) (BIANCHI et al., 1993). Foi proposto um método direto para detecção da fragmentação do DNA espermático, o teste de dispersão de esperma cromatina (SCD) (FERNÁNDEZ et al., 2003).

No entanto, até agora, estes métodos mais simples não têm sido rotineiramente introduzidos, provavelmente porque estes ensaios requerem corantes específicos e outros reagentes que não são utilizados na prática diária, ou simplesmente devido à dificuldade na implementação de rotina levando a alterar os procedimentos (SOUSA et al., 2009). Algumas requerem equipamentos de alto custo, por conseguinte, não são apropriadas para condições de campo (MOTA; RAMALHO-SANTOS, 2006).

Foi desenvolvido por Mello em 1982 um método para avaliação da cromatina, pelo uso do corante azul de toluidina, que determina o grau de descondensação da cromatina espermática (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005). Assim pode-se conhecer a susceptibilidade aos danos no DNA dos espermatozoides e fornecer informações mais precisas do potencial reprodutivo dos garanhões. A estabilidade da cromatina é determinada realizando esfregaços corados com esta substância química e avaliados por análise de imagem computacional (SILVA et al., 2009). Pesquisas anteriores usaram esta técnica para determinar grau de descondensação da cromatina em várias espécies humana (ERENPREISS et al., 2006), bovina (BELETTI; FONTOURA COSTA; GUARDIEIRO, 2005), caprinos e ovinos (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010), galo (RODRIGUES, ROCHA; BELETTI, 2009) e equino (NAVES et al., 2004). O azul de toluidina é um corante catiônico que apresenta metacromasia, isto é, uma mudança de cor para violeta, induzida por ressonância eletrônica entre várias moléculas de corante empilhadas. Esta propriedade é útil para avaliar anormalidades na condensação da cromatina espermática uma vez que quando esfregaços de espermatozoides são corados com azul de toluidina em pH 4,0, as moléculas de corante se ligam a fosfatos ionizados no DNA (MELLO, 1982).

3 HIPÓTESE

3. HIPÓTESE

A refrigeração do sêmen equino a 5°C causa diminuição da motilidade espermática, da integridade das membranas plasmática e acrossomal, da função mitocondrial, bem como aumento das alterações morfológicas e descondensação da cromatina no decorrer de 12 horas, sendo que o grau de cada lesão está diretamente relacionado à constituição do meio de diluição.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 GERAIS

Otimizar o processo de refrigeração de sêmen equino preservado a 5°C utilizando diferentes diluidores e armazenado por até 12 horas.

4.2 ESPECÍFICOS

Verificar os efeitos da refrigeração do sêmen equino a 5°C em diferentes diluidores até 12 horas sobre:

- Os parâmetros da cinética espermática proporcionados pelo sistema computadorizado de análise espermático (CASA).
- A preservação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial espermáticas por associação de sondas fluorescentes.
- A morfologia espermática, avaliada por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).
- O grau de descondensação da cromatina espermática pela técnica do azul de toluidina.

5 MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga, no período de outubro a dezembro de 2012.

5.2 ANIMAIS

Para este experimento foram utilizados quatro garanhões clinicamente sadios, de raças de sela, com idade variando entre 7 e 15 anos (Quadro 3), pertencentes ao Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), SP. Os animais foram mantidos com manejo nutricional e sanitário idênticos, sendo alimentados com feno, concentrado, capim picado, disponibilizando sal mineral e água *ad libitum*.

Quadro 3 – Animais alojados no Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS) utilizados no experimento - Pirassununga – 2013

NOME	RAÇA	IDADE
COMANDER (COM)	Apaloosa	14,5 anos
JUHR (JUR)	PSA	21 anos
GRAFITE (GRA)	PSA	7 anos
NARAY	PSA	7,1 anos

5.3 COLHEITA DO SÊMEN

Foram feitas três colheitas pré-experimento para nivelamento biológico da produção espermática dos garanhões. As colheitas de sêmen foram realizadas utilizando vagina

artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu – SP, Brasil), acoplado a um tubo coletor de plástico. A temperatura interna da vagina artificial ficava a 42°C. Antes da colheita, foi realizada a limpeza do pênis do garanhão com água a 37°C e algodão. As colheitas foram realizadas utilizando-se um tronco ou “égua-manequim”, onde foi colocado antes da colheita urina de égua em estro, e em algumas ocasiões para auxiliar o processo de colheita, uma égua em estro era trazida para ficar do lado do tronco. Após a colheita, o sêmen foi encaminhado imediatamente para o laboratório.

5.4 ANÁLISES DO SÊMEN

As condições para a análise do sêmen para evitar choque térmico e alterações das características do sêmen são controladas no laboratório, onde todo o material que entra em contato com o sêmen é mantido aquecido, limpo e seco. O sistema de controle da temperatura inclui manter o laboratório a temperatura ambiente e os materiais que entram em contato com o sêmen permanecem a 37°C com auxílio de mesa aquecedora, platina aquecedora e banho-Maria seco (Figura 1). Imediatamente após a colheita, o sêmen foi filtrado para a retirada da fração gel utilizando um filtro de nylon e depositado em um Becker para ser avaliado quanto às características como o aspecto do ejaculado e volume sem o gel (mL), motilidade total e progressiva, vigor, concentração e morfologia espermática.

Figura 1 – Material e equipamentos para análises de sêmen aquecidos a 37°C no Laboratório de Biotecnologia do sêmen e Andrologia (LBSA) - Pirassununga – 2013

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

5.4.1 Concentração espermática

Alíquotas de 10 μL de sêmen foram diluídas em 990 μL de formol salino, numa proporção de 1:100 depositados num microtubo. A leitura da concentração espermática foi feita usando uma câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum em aumento de 400x.

5.4.2 Avaliação computadorizada da cinética espermática

O sêmen foi diluído no meio TALP sperm (BAVISTER et al., 1983) a uma concentração de 25×10^6 spz/mL para avaliar os parâmetros de motilidade no sistema computadorizado de análise espermático (CASA, Computer-Assisted Sperm Analyses). Dez microlitros da amostra foram colocados na câmara de leitura (Makler® counting chamber, Sefi-Medical Instruments Ltda.) previamente aquecida (37°C), e esta amostra foi inserida no aparelho modelo HTM-IVOS (Versão 12.3) da Hamilton-Thorn Biosciences (Beverly, MA, USA) (Figura 2).

Figura 2 – **A.** Aparelho para análise computadorizada do espermatozoide (CASA), modelo HTM-IVOS; marca Hamilton-Thorne Biosciences (Beverly, MA, USA). **B.** Câmara de Makler - Pirassununga – 2013

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Este equipamento realiza a análise do sêmen por sistema computadorizado, sendo que para a análise do movimento espermático utiliza-se o programa Animal Motility. Previamente foram realizados ajustes (set up) (ANEXO A) no equipamento para a análise de sêmen equino (Figura 3). A escolha manual do campo de leitura e análise foram feitas, selecionando os cinco melhores campos por amostra. Os parâmetros avaliados foram: Motilidade total (MT %), motilidade progressiva (MP %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimentos (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e velocidade rápida (%), segundo metodologia descrita por Arruda (2000).

Figura 3 – Imagem da tela mostrando o *setup* do programa Animal Motility do aparelho HTM-IVOS, versão 12.3, Hamilton Thorne Research, Beverly, Massachusetts, USA - Pirassununga – 2013

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

5.4.3 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e a função mitocondrial foram preparadas as sondas fluorescentes e armazenadas congeladas (ANEXO B). Um alíquota de sêmen foi retirada das amostras e adicionada ao TALP *sperm* modificado, em microtubos (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, a fim de se obter amostras com concentração de 25×10^6 sptz/mL em um volume final de 1 mL. Após a diluição, colocou-se uma alíquota de 150 µL em um microtubo de 600 µL, e adicionou-se 3 µL de Iodeto de Propídio (PI-0,5 mg/mL, P4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), 2 µL de Hoechst 33342 (H342 5mg/mL, Molecular probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), a seguir, 5 µL de JC-1 (153 µM, T-3168, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), conjuntamente com a adição de 80 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA-100 µg/mL, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), segundo a metodologia descrita por Celeghini et al. (2010).

Esta mistura (Quadro 4) foi homogeneizada e incubada à 37°C por 8 minutos, na ausência de luz. Após esse período de incubação, uma gota de 3 µL desta amostra foi retirada e colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas (37°C) e imediatamente avaliada em microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência, Marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655).

Quadro 4 – Protocolo de associação das sondas fluorescentes para integridade de membranas plasmática, acrossomal e alto potencial de mitocôndria - Pirassununga – 2013

Sondas	Quantidade
Sêmen	150 µL
PI ¹	3 µL
H342 ²	2 µL
JC-1 ³	5 µL
FITC-PSA ⁴	80 µL

PI¹: iodeto de propídio; H342²: Hoechst; JC-1³: iodeto de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina; FITC-PSA⁴: aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína. **Fonte:** Celeghini et al., 2010

Para a leitura, em aumento de 1000X, as células foram classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, realizando uma contagem de 200 células por amostra de acordo com o padrão descrito por Celeghini et al. (2010) (Quadro 5).

Quadro 5 – Classificação das células espermáticas de acordo com a coloração fluorescente emitida no protocolo de associação de PI, H342, FITC-PSA e JC-1 - Pirassununga – 2013

Parâmetro	Sigla		Descrição da fluorescência
Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial mitocondrial	PIAIA		Cabeça azul Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e baixo potencial mitocondrial	PIAIB		Cabeça azul Peça intermediária verde
Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e com alto potencial mitocondrial	PIALA		Cabeça azul Acrossoma verde intenso Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial	PIALB		Cabeça azul Acrossoma verde intenso Peça intermediária verde
Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e com alto potencial mitocondrial	PLAIA		Cabeça vermelha Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e baixo potencial mitocondrial	PLAIB		Cabeça vermelha Peça intermediária verde
Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e com alto potencial mitocondrial	PLALA		Cabeça vermelha Acrossoma verde intenso Peça intermediária vermelha
Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial	PLALB		Cabeça vermelha Acrossoma verde intenso Peça intermediária verde

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Da somatória do percentual de cada uma destas categorias de células acima descritas, avaliou-se o total de células com membrana plasmática intacta (MPI), o total de células com acrossoma intacto (MAI), e o total de células com alto potencial de mitocôndria (APM), seguindo as fórmulas descritas no Quadro 6.

Quadro 6 – Fórmula para o cálculo da porcentagem de células com membranas íntegras, segundo a leitura no microscópio de epifluorescência

%MPI	PIAIA + PIAIB + PIALA + PIALB
%MAI	PIAIA +PIAIB + PLAIA + PLAIB
%APM	PIAIA + PIALA + PLAIA + PLALA

MPI: células com membrana plasmática intacta; MAI: células com acrossoma intacto; APM: células com alto potencial de mitocôndria; PIAIA: Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial mitocondrial; PIAIB: Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com baixo potencial mitocondrial; PIALA: Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e alto potencial mitocondrial; PIALB: Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial; PLAIA: Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial; PLAIB: Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto e baixo potencial mitocondrial; PLALA: Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e alto potencial mitocondrial; PLALB: Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado e baixo potencial mitocondrial.

5.4.4 Morfologia espermática

Alíquotas de sêmen foram retiradas para análise posterior da morfologia espermática, adicionadas a 0,5 mL de solução de formol salino aquecido a 37°C para a fixação e então refrigeradas, permanecendo até o momento da análise. Foi utilizada a técnica da câmara úmida, com contagem de 200 células, em aumento de 1.000 x, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (Modelo Eclipse 80i, Nikon®). As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores (BLOM, 1950).

5.4.5 Análise da cromatina espermática

Seguindo a técnica descrita por Navas et al. (2004), da “metacromasia induzida” para identificação de alterações de cromatina em espermatozoides de equino, foram realizados esfregaços de sêmen, utilizando lâminas com extremidade fosca previamente identificadas, deixando secar ao ar. Os esfregaços foram fixados em solução de etanol-ácido acético (3:1) V/V durante 1 minuto e posteriormente em solução de 70% etanol e mantidos durante 3 minutos. Logo após, foi hidrolisado durante 5 minutos em solução de ácido clorídrico (HCL) 4N e lavados com água destilada intensamente, deixando secar ao ar. (Figura 4). Para realizar a coloração foi colocada uma gota de azul de toluidina (AT) 0,025% em tampão fosfato-ácido cítrico (tampão McIlvaine) pH 4 (ANEXO C) e coberto com lamínula (24x50mm). A gota de corante cobriu todo o esfregaço e após três minutos foi retirado o excesso de corante encostando-se um fragmento de papel de filtro na borda da lamínula.

Figura 4 – Técnica de azul de toluidina **A.** Fixação do esfregaço **B.** Coloração das lâminas de esfregaço com o de azul de toluidina (AT) - Pirassununga – 2013

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

A leitura foi feita entre três e vinte minutos após a montagem da lâmina com o corante AT, utilizou-se o microscópio (Nikon Eclipse E200) no campo claro regulado no modo de “iluminação de Köhler”, todos os diafragmas da fonte de luz, do condensador e da objetiva,

permaneceram totalmente abertos para evitar a formação de contraste de fase, o que iria interferir na avaliação da cromatina. Utilizou-se um aumento de 1.000 x (Objetiva 100x).

A leitura foi baseada na técnica de Carretero et al. (2009) que observaram três padrões de coloração diferentes nas células espermáticas coradas com o azul de toluidina. Foram contadas 500 células do esfregaço e classificadas em três grupos de células, sendo que o grupo ATI corado em azul claro, para as células sem descondensação, grupo ATII para as células de cor roxa, para as células com descondensação intermediária e grupo ATIII para as células cor violeta, que indicam alta descondensação (Figura 5).

Figura 5 – Classificação do grau de descondensação da cromatina espermática adaptado de Carretero et al. (2009). **A.** células com cromatina normal (ATI), **B.** células com cromatina moderadamente descondensada (ATII), e **C.** células com cromatina altamente descondensada (ATIII) - Pirassununga – 2013

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

5.5 COMPOSIÇÃO E PREPARAÇÃO DE DILUIDORES

Foram preparados três diluidores nomeados: SMT, à base de leite desnatado e meio de Tyrode (adaptado de PADILLA; FOOTE, 1991), BSAG, diluidor contendo BSA (adaptado de GIBB et al., 2011) e SMK, à base de leite desnatado (KENNEY et al., 1975; controle). Os componentes dos diluidores adaptados estão descritos no quadro 7. Foi preparado um volume de 1 litro de diluidor e dividido em tubos cônicos estéreis de 50 mL, depositando um volume de 32 mL do diluidor, sendo devidamente identificado cada tratamento e estocado a temperatura de -80°C. Minutos antes de cada colheita era descongelado em banho-Maria a 37°C um tubo cônico correspondente a cada diluidor e submetido a mensuração de pH para controle do diluidor. Os diluidores foram mantidos com o pH entre 7,3 e 7,6 (ANEXO D). Quando o pH não se encontrava entre o intervalo mencionado, este foi ajustado utilizando

uma solução de NaOH ou HCl, para aumentar ou reduzir o pH, respectivamente. Só no caso do diluidor BSAG, depois de ser descongelado para ser usado no dia da colheita, era acrescentado 1% de BSA, homogeneizado no vortex e posteriormente aferido o pH.

Quadro 7 – Composição dos diluidores para refrigeração de sêmen equino utilizados no experimento (SMT, BSA e SMK), Pirassununga – 2013.

Componentes	SMT	BSAG	SMK
Leite em pó	15,6 g	-	24 g
Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	31,85 g	31,85 g	49 g
Lactato de sódio (NaC ₃ H ₅ O ₃)	1,085	1,085 mL	-
Piruvato de sódio (C ₃ H ₄ O ₃)	0,0385 g	0,0385 g	-
HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S)	0,833 g	0,833 g	-
Fosfato de sódio dihidrogenado (NaH ₂ PO ₄)	0,0175g	0,0175 g	-
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,735 g	0,735 g	1,5 g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ 2H ₂ O)	0,1015 g	0,1015 g	
Cloreto de potássio (KCl)	0,655 g	0,6545 g	-
Cloreto de Manganésio MgCl*6H ₂ O	0,0595 g	0,028g-	-
Cloreto de sódio (NaCl)	1,47 g	1,47 g	-
Albumina sérica bovina (BSA)	-	1% (p/v)	-
Milli-q (Millipore™)	1000mL	1000mL	1000 mL
Penicilina,	600000UI	600000UI	600000UI
Estreptomicina	60mg	60mg	60mg

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

5.6 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

Depois de mesurada a concentração espermática, foi feito o cálculo para determinar o volume de diluidor a acrescentar para conseguir uma concentração de 50×10^6 spz/mL em um volume total de 30 mL de diluidor com sêmen. A amostra de sêmen foi depositada em um tubo cônico de 15 mL com o tratamento, depois de estar bem homogeneizado, o volume total foi dividido em três partes, correspondendo 10 mL que foram envasados em recipientes de plástico (Bisnagas BOTU-IA®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), retirando-se o ar. Então o sêmen foi colocado em container apropriado para refrigeração de sêmen equino, usaram-se caixas BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), em cada caixa era colocada uma bisnaga com o respectivo diluidor e duas bisnagas preenchidas com água para completar o volume explicitado, dois gelos recicláveis para que ela atingisse a curva de 5°C (Figura 6). Seguido da colocação das bisnagas, as caixas eram fechadas e abertas só no momento da avaliação respectiva, para não alterar a temperatura interna ao abrir o container. Foram usadas caixas devidamente identificadas por cada tratamento e tempo de avaliação (4, 8 e 12 horas) e permaneceram a temperatura ambiente, sendo em total 9 caixas utilizadas por ejaculado (Figura 7).

Figura 6 – Gráfico da curva de refrigeração de sêmen equino nas caixas BotuFLEX® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) - Pirassununga – 2013.

Fonte: Botupharma, Botucatu, SP, Brasil

Figura 7 - Sistema de refrigeração de sêmen equino. Caixas BotuFLEX[®] (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

5.6.1 Análise do sêmen refrigerado

Foram realizadas avaliações com intervalos de 4 horas até 12 horas de refrigeração, sendo a primeira análise realizada 5 minutos após a diluição do sêmen (T0), as demais realizadas 4 h (T4), 8 h (T8) e 12 h (T12) após a diluição e refrigeração do sêmen. As amostras foram submetidas novamente à análise computadorizada do sêmen (CASA), análise da morfologia espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, e análises da alteração da cromatina, segundo as técnicas supracitadas. Antes das avaliações, as amostras refrigeradas a 5°C, foram homogeneizadas, e uma alíquota de 1,5 mL foi depositada em microtubos pré-aquecidos a 37°C e foram mantidos em banho-maria seco a 37°C durante 5 minutos.

Foi definido um sistema de avaliação rotacional para garantir uniformidade no tempo de avaliação, controlando a hora de início da diluição e da refrigeração, ordem para abrir as caixas e para avaliação consecutiva do respectivo tratamento. Na primeira colheita do garanhão número 1, a primeira análise do primeiro tratamento foi 5 minutos após a diluição, a primeira análise do segundo tratamento foi 3 minutos depois da primeira (8 minutos após a diluição), e do terceiro 3 minutos após a segunda (11 minutos após a diluição). As ordens de análises dos tratamentos foram alternadas nas outras colheitas para reduzir o efeito do tempo de avaliação (de 5 a 11 minutos).

5.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 8 – Esquema simplificado do delineamento experimental, apresentando o processamento do sêmen, os tratamentos, a refrigeração do sêmen e os momentos de análises do sêmen - Pirassununga – 2013

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991)
BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011)
SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)
Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com prévia verificação da normalidade dos resíduos e da homogeneidade das variâncias. As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas, então foram submetidas à transformação em arco-seno. Os dados transformados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM), empregando-se o programa SAS (1998). Às análises estatísticas destas variáveis foram ainda adicionadas do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos três momentos de amostragem. As probabilidades de interações com o tempo foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisse, utilizando-se o comando REPEATED gerado pelo procedimento GLM (PROC GLM do SAS). As análises dentro de cada tempo foram realizadas pelo teste de Tukey. As hipóteses testadas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias e seus respectivos desvios padrão (média $\pm$ desvios padrão).

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

Nesta seção encontram-se os resultados obtidos de todas as variáveis estudadas correspondentes aos diluidores definidos para este experimento (SMT, BSAG e SMK). Os índices são descritos em tabelas, expressando os valores das médias e desvios padrão, e o valor real do P, mas estabelecendo uma diferença significativa de ($P < 0,05$).

6.1 CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS DO SÊMEN *IN NATURA* DOS GARANHÕES

Na tabela 1 estão apresentados os resultados de volume, concentração, vigor e motilidade subjetiva do sêmen *in natura* dos quatro garanhões.

Tabela 1 – Médias $\pm$ desvios padrão do volume do ejaculado (sem gel), concentração, vigor e motilidade subjetiva do sêmen *in natura* dos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR) - Pirassununga – 2013

VARIÁVEIS	GARANHÕES				Valor de P
	COM	GRA	JUR	NAR	
Volume	69,2 $\pm$ 12,2 ^{A,B}	91,7 $\pm$ 14,4 ^A	58,7 $\pm$ 10,3 ^B	82,5 $\pm$ 15,0 ^{A,B}	0,0285
Concentração (sptz x 10 ⁶ /mL)	330,6 $\pm$ 125,1	300,0 $\pm$ 192,5	200,0 $\pm$ 134,3	511,7 $\pm$ 295,9	0,3820
Vigor (0-5)	2,7 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,2	3,4 $\pm$ 0,2	0,0529
Motilidade (%)	83,8 $\pm$ 2,5 ^A	68,8 $\pm$ 2,5 ^B	73,8 $\pm$ 8,5 ^{A,B}	80,0 $\pm$ 7,1 ^{A,B}	0,0155

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

As informações sobre as médias e desvios padrão das características do movimento espermático do sêmen equino *in natura* avaliadas pelo sistema computadorizado de análises espermático (CASA) são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 – Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros da cinética espermática do sêmen equino *in natura* avaliados pelo CASA, nos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR) - Pirassununga – 2013

VARIÁVEIS	GARANHÕES				Valor de P
	COM	GRA	JUR	NAR	
MT ¹ (%)	94,0 $\pm$ 2,1 ^A	68,5 $\pm$ 4,5 ^B	88,0 $\pm$ 3,7 ^A	86,7 $\pm$ 8,3 ^A	<0,0001
MPROG ² (%)	23,5 $\pm$ 6,6	26,7 $\pm$ 7,7	29,2 $\pm$ 2,9	36,2 $\pm$ 13,6	0,2444
VAP ³ (μ m/s)	155,9 $\pm$ 22,3 ^A	105,3 $\pm$ 10,9 ^B	122,2 $\pm$ 6,5 ^{AB}	111,1 $\pm$ 24,4 ^B	0,0072
VSL ⁴ (μ m/s)	89,5 $\pm$ 21,6	64,4 $\pm$ 10,1	70,4 $\pm$ 3,9	75,1 $\pm$ 21,0	0,2059
VCL ⁵ (μ m/s)	301,4 $\pm$ 54,7 ^A	173,1 $\pm$ 10,0 ^B	230,5 $\pm$ 10,5 ^B	198,1 $\pm$ 24,5 ^B	0,0004
ALH ⁶ (μ m)	10,4 $\pm$ 2,5 ^A	6,1 $\pm$ 0,3 ^B	7,4 $\pm$ 0,8 ^B	6,3 $\pm$ 0,8 ^B	0,0026
BCF ⁷ (Hz)	32,1 $\pm$ 5,8 ^B	34,8 $\pm$ 5,1 ^{A,B}	40,6 $\pm$ 1,9 ^{A,B}	42,1 $\pm$ 1,4 ^A	0,0138
STR ⁸ (%)	54,2 $\pm$ 5,4 ^B	62,5 $\pm$ 3,8 ^{A,B}	57,2 $\pm$ 2,7 ^{A,B}	65,5 $\pm$ 5,8 ^A	0,0199
LIN ⁹ (%)	29,5 $\pm$ 3,1 ^B	41,5 $\pm$ 4,35 ^A	32,7 $\pm$ 1,2 ^{A,B}	39,7 $\pm$ 9,4 ^{AB}	0,0268
RAP ¹⁰ (%)	89,5 $\pm$ 5,9 ^A	57,5 $\pm$ 8,2 ^B	82,5 $\pm$ 4,9 ^A	76,0 $\pm$ 17,8 ^{A,B}	0,0062

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey

MT¹: Motilidade total; MPROG²: motilidade progressiva; VAP³: Velocidade de trajeto; VSL⁴: Velocidade progressiva; VCL⁵: Velocidade curvilínea; ALH⁶: Amplitude lateral da cabeça; BCF⁷: Frequência de batimento flagelar; STR⁸: Retilinearidade e LIN⁹: Linearidade; RAP¹⁰ espermatozoides rápidos.

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Na tabela 3, são descritos os percentuais de membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial, bem como as alterações da morfologia espermática do sêmen equino *in natura*.

Tabela 3 – Médias $\pm$ desvios padrão das porcentagens da integridade das membranas espermáticas e alterações na morfologia espermática do sêmen *in natura* dos ganhanhos: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR) - Pirassununga – 2013

VARIÁVEIS	GARANHÕES				Valor do P
	COM	GRA	JUR	NAR	
Integridade das Membranas %					
PIAIA ¹	63,4±21,4	40,6±16,9	52,9±23,9	43,2±19,2	0,4199
MPI ²	70,6±18,0	55,9±22,4	63,9±19,3	51,7±25,0	0,6165
APM ³	78,0±10,0	62,6±14,9	69,7±21,2	67,2±13,2	0,5713
MAI ⁴	92,0±4,0	93,0±4,1	95,1±5,8	85,4±10,6	0,2468
Morfologia Espermatica %					
DMA ⁵	23,9±5,5	33,4±4,2	28,4±5,0	23,5±4,9	0,0492
DME ⁶	3,7±3,9 ^B	16,7±2,7 ^A	6,7±1,4 ^B	10,1±3,9 ^{AB}	0,0005
DT ⁷	27,5±6,0 ^B	50,1±4,7 ^A	35,1±3,5 ^B	33,6±2,6 ^B	<0,0001
PCAB ⁸	22,0±5,9 ^B	32,3±5,1 ^A	22,0±4,8 ^B	9,5±2,4 ^C	0,0002
PPI ⁹	0,25±0,3 ^C	2,1±0,8 ^{BC}	5,6±0,6 ^A	3,7±2,9 ^{AB}	0,0024
PCAU ¹⁰	5,2±3,2 ^B	15,6±0,9 ^A	7,5±1,3 ^B	18,4±5,7 ^A	0,0003
POUCH ¹¹	17,4±5,8 ^A	11,0±1,5 ^{AB}	9,4±3,5 ^B	31,6±2,5 ^C	0,0004

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey

PIAIA¹: células com membrana plasmática íntata, acrossoma íntato e alto potencial de mitocôndria; MPI²: Células com membrana plasmática íntata; APM³: células com alto potencial de mitocôndria; MAI⁴: Células com acrossoma íntato; DMA⁵: Defeitos maiores; DME⁶: Defeitos menores; DT⁷: Defeitos totais; PCAB⁸: patologias da cabeça; PPI⁹: Patologia da peça intermediária; PCAU¹⁰: Patologias de cauda; POUCH¹¹: Pouch formation;

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Na tabela 4 são descritas as médias e desvios padrão do grau de descondensação da cromatina espermática. É possível observar que a cromatina espermática da amostra seminal *in natura*, destes animais é altamente compactada. O ganhão Grafite (GRA) apresentou um valor mais baixo de espermatozoides com cromatina normal (ATI) e maior porcentagem de espermatozoides com cromatina moderadamente descondensada (ATII), em comparação aos outros ganhões utilizados neste experimento. A presença de células altamente descondensadas (ATIII) foi mínima, sem diferença entre os quatro ganhões.

Tabela 4 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com alteração da cromatina espermática no sêmen *in natura* dos garanhões: Commander (COM), Grafite (GRA), Jurh (JUR) e Narai (NAR) - Pirassununga – 2013

PARÂMETROS	GARANHÕES				Valor do P
	COM	GRA	JUR	NAR	
ATI	99,2 $\pm$ 0,3 ^A	89,6 $\pm$ 5,6 ^B	98,7 $\pm$ 0,6 ^A	98,7 $\pm$ 0,6 ^A	0,0010
ATII	0,7 $\pm$ 0,4 ^B	7,6 $\pm$ 2,5 ^A	1,0 $\pm$ 0,5 ^B	1,0 $\pm$ 0,5 ^B	<0,0001
ATIII	0,2 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 3,1	0,4 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,3	0,0770

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

ATI= Cromatina normal; ATII= Cromatina moderadamente descondensada; ATIII= Cromatina altamente descondensada.

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2 EFEITOS DOS DILUIDORES SOBRE OS PARAMETROS DA CINÉTICA ESPERMÁTICA

6.2.1 Motilidade total (MT%)

Houve efeito de interação entre tempo e tratamento para o BSA e SMK entre o T0 e o T4, também o SMK apresentou interação com o SMT entre o T4 e T8. A porcentagem de espermatozoides móveis após 5 minutos da diluição (T0) não apresentou diferença entre os tratamentos. Após 4 horas de refrigeração (T4) o SMT foi superior ao BSAG, mas ambos não diferiram do SMK. Decorridas 8 horas de refrigeração (T8) o SMT e o SMK foram superiores ao BSAG. Finalmente após 12 horas de refrigeração (T12), o SMK preservou melhor a motilidade que o BSAG, sendo igual ao SMT. Entre o SMT e o BSAG não foram encontradas diferenças significativas neste momento (Tabela 5). Para esta característica foram observados efeitos oscilantes dos diluidores ao longo do tempo. Apresentaram um declínio da motilidade total desde o T0 até às 12 horas (12%, 22,8% e 2,5%) para o diluidor SMT, BSAG e SMK respectivamente.

Tabela 5 – Médias $\pm$ desvios padrão da Motilidade espermática total (MT, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	85,4 $\pm$ 9,1	82,4 $\pm$ 14,6	80,3 $\pm$ 12,3	0,2236
T4	84,1 $\pm$ 16,4 ^A	73,2 $\pm$ 25,4 ^B	81,1 $\pm$ 13,8 ^{AB}	0,0183
T8	77,7 $\pm$ 24,7 ^A	64,2 $\pm$ 34,5 ^B	79,8 $\pm$ 16,1 ^A	0,0123
T12	73,4 $\pm$ 27,7 ^{AB}	59,6 $\pm$ 34,2 ^B	77,8 $\pm$ 13,4 ^A	0,0077

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração.

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.2 Motilidade Progressiva (MPROG %)

Em relação à motilidade progressiva, observou-se superioridade para o SMK em relação ao BSAG nos tempos T4, T8 e T12 conforme descrito na tabela 6. O SMT foi inferior ao SMK no T0, mas similar nos tempos T4, T8 e T12. Foi encontrado um valor reduzido de motilidade progressiva (MPROG %) no diluidor BSAG em comparação ao SMT, somente após 12 horas de refrigeração, sendo similares nos outros tempos (T0, T4 e T8 horas).

Tabela 6 – Médias $\pm$ desvios padrão da Motilidade progressiva (MPROG, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	29,2 $\pm$ 5,9 ^B	32,3 $\pm$ 9,0 ^{AB}	35,6 $\pm$ 9,8 ^A	0,0485
T4	30,0 $\pm$ 11,5 ^{AB}	27,6 $\pm$ 11,2 ^B	36,8 $\pm$ 8,5 ^A	0,0098
T8	26,2 $\pm$ 12,8 ^{AB}	19,8 $\pm$ 11,1 ^B	30,6 $\pm$ 9,5 ^A	0,0028
T12	25,1 $\pm$ 12,0 ^A	16,7 $\pm$ 9,0 ^B	27,1 $\pm$ 8,4 ^A	0,0005

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.3 Velocidade de trajeto (VAP)

Em relação ao VAP, o efeito dos diluidores foi significativo para o tempo 0 (T0) após 5 minutos da diluição e para o tempo 4 horas (T4) da refrigeração ($p < 0,05$). Os outros tempos não diferiram entre tratamentos. No tempo 0 horas (T0) o SMT foi superior ao BSAG, e este último foi superior ao SMK. Após 4 horas de refrigeração SMT permaneceu melhor que o BSAG e SMK, mas não foi observada diferença entre BSAG e SMK. Já depois de 8 horas de refrigeração (T8) não houve diferença entre os diluidores (Tabela 7).

Tabela 7 – Média $\pm$ desvio padrão da velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	151,7 $\pm$ 25,6 ^A	117,4 $\pm$ 27,2 ^B	97,6 $\pm$ 20,4 ^C	<0,0001
T4	141,8 $\pm$ 26,5 ^A	122,5 $\pm$ 35,3 ^B	114,1 $\pm$ 9,6 ^B	0,0005
T8	133,7 $\pm$ 33,8	119,7 $\pm$ 41,2	119,0 $\pm$ 18,0	0,1025
T12	127,1 $\pm$ 38,0	111,0 $\pm$ 41,7	114,5 $\pm$ 14,8	0,1522

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.4 Velocidade progressiva (VSL)

Houve efeito do diluidor para a VSL só no tempo 0 horas (T0), sendo que os valores foram maiores para o SMT quando comparados ao BSAG e SMK. Os diluidores BSAG e SMK não apresentaram diferença entre eles. Não houve efeito dos diluidores nos outros tempos avaliados (Tabela 8).

Tabela 8 - Média $\pm$ desvio padrão da Velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	91,8 $\pm$ 16,8 ^A	73,3 $\pm$ 9,6 ^B	68,6 $\pm$ 13,2 ^B	<0,0001
T4	87,6 $\pm$ 20,2	79,7 $\pm$ 19,1	77,2 $\pm$ 9,4	0,0685
T8	81,9 $\pm$ 21,7	71,7 $\pm$ 19,7	75,5 $\pm$ 12,8	0,1329
T12	76,3 $\pm$ 22,9	65,7 $\pm$ 16,3	69,9 $\pm$ 11,0	0,1066

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.5 Velocidade Curvilinear (VCL)

Os valores de VCL em T0 e T4 foram maiores no SMT do que BSAG e SMK, não diferindo entre BSAG e SMK. Não foram observadas diferenças entre os diluidores nos outros momentos de avaliação (T8 e T12) (Tabela 9).

Tabela 9 – Média $\pm$ desvio padrão da Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	284,5 $\pm$ 53,9 ^A	214,0 $\pm$ 57,6 ^B	188,7 $\pm$ 35,0 ^B	<0,0001
T4	260,3 $\pm$ 51,3 ^A	222,4 $\pm$ 77,9 ^B	211,3 $\pm$ 19,5 ^B	0,0014
T8	250,0 $\pm$ 65,9	220,3 $\pm$ 83,5	224,5 $\pm$ 35,0	0,0936
T12	237,8 $\pm$ 71,9	204,5 $\pm$ 84,4	220,2 $\pm$ 29,2	0,1335

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.6 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH)

O deslocamento lateral de cabeça (ALH) apresentou efeito de interação entre tempo e tratamento, sendo que o SMT teve os valores maiores no tempo 0 (T0), não apresentou diferença entre os outros tratamentos no tempo 4 (T4), mas no tempo 8 (T8) foi superior ao BSAG e similar ao SMK; nesse mesmo tempo, não foram encontradas diferenças entre BSAG e SMK. No tempo 12 horas (T12) de avaliação os valores foram semelhantes para os três diluidores como descrito na tabela 10.

Tabela 10 – Média $\pm$ desvio padrão da amplitude lateral de cabeça espermática (ALH, μm) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	9,1 $\pm$ 1,8 ^A	6,7 $\pm$ 1,6 ^B	7,3 $\pm$ 1,1 ^B	<0,0001
T4	8,3 $\pm$ 1,7	7,7 $\pm$ 2,3	7,4 $\pm$ 1,1	0,0701
T8	8,2 $\pm$ 2,2 ^A	7,1 $\pm$ 2,3 ^B	7,6 $\pm$ 1,0 ^{A,B}	0,0227
T12	7,6 $\pm$ 2,2	7,0 $\pm$ 2,2	7,7 $\pm$ 0,8	0,2124

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$)

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.7 Frequência de Batimentos (BCF)

A Frequência de Batimento (BCF) não apresentou interação, nem efeito isolado do tempo e do diluidor. Os valores de médias e desvios padrão são mostrados na tabela 11.

Tabela 11 – Média $\pm$ desvio padrão da frequência de batimento (BCF, Hz) espermático no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C - Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	33,0 $\pm$ 5,9	36,1 $\pm$ 2,0	34,5 $\pm$ 5,2	0,0810
T4	34,0 $\pm$ 5,4	33,4 $\pm$ 4,3	34,2 $\pm$ 5,6	0,8533
T8	35,2 $\pm$ 4,8	35,0 $\pm$ 3,4	36,9 $\pm$ 2,5	0,2397
T12	36,3 $\pm$ 5,4	34,9 $\pm$ 2,9	37,3 $\pm$ 2,2	0,1773

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.8 Retilinearidade (STR)

Na tabela 12 estão demonstrados os resultados da retilinearidade (STR). Para esta característica foi encontrada diferença significativa unicamente no tempo 0 horas (T0), sendo o diluidor SMK quem apresentou o maior valor em comparação aos outros diluidores. O comportamento nos tempos T4, T8 e T12 horas foi similar entre os tratamentos.

Tabela 12 – Média $\pm$ desvio padrão da Retilinearidade espermática (STR, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	59,9 $\pm$ 3,9 ^B	64,0 $\pm$ 8,0 ^B	70,2 $\pm$ 4,5 ^A	<0,0001
T4	61,6 $\pm$ 6,3	66,1 $\pm$ 10,0	67,2 $\pm$ 3,0	0,0509
T8	61,8 $\pm$ 6,4	62,2 $\pm$ 8,8	63,1 $\pm$ 6,0	0,8395
T12	61,6 $\pm$ 8,1	62,6 $\pm$ 10,6	61,3 $\pm$ 6,4	0,8604

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.9 Linearidade (LIN)

Quanto à linearidade, foi encontrado maior valor para BSAG do que SMT no T0, não sendo observada nenhuma outra diferença entre os tratamentos (Tabela 13).

Tabela 13 – Média $\pm$ desvio padrão da Linearidade espermática (LIN, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	34,4 $\pm$ 4,2 ^B	39,4 $\pm$ 7,3 ^A	37,4 $\pm$ 2,4 ^{AB}	0,0063
T4	35,5 $\pm$ 4,3	41,0 $\pm$ 12,8	38,8 $\pm$ 2,6	0,1025
T8	35,7 $\pm$ 5,5	38,2 $\pm$ 10,0	35,6 $\pm$ 3,6	0,3217
T12	35,5 $\pm$ 6,8	38,3 $\pm$ 10,9	34,2 $\pm$ 4,9	0,2388

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.2.10 Espermatozoides Rápidos (RAP %)

O RAP, outro parâmetro de qualidade espermática, teve um comportamento diferente às outras variáveis de qualidade espermática. Segundo o observado na tabela 14 no tempo T0 horas não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, no tempo T4 o SMK e o SMT foram iguais, mas superiores ao BSAG. Em T8 e T12 SMK foi melhor que BSAG, não sendo observada diferença entre SMT e BSAG.

Tabela 14 – Média $\pm$ desvio padrão de espermatozoides com velocidade rápida (RAP, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Valor do P
	SMT	BSAG	SMK	
T0	78,9 $\pm$ 9,5	72,8 $\pm$ 17,6	69,6 $\pm$ 18,1	0,0648
T4	69,7 $\pm$ 27,0 ^A	56,6 $\pm$ 35,1 ^B	71,5 $\pm$ 19,3 ^A	0,0034
T8	69,7 $\pm$ 27,0 ^{AB}	56,6 $\pm$ 35,1 ^B	71,5 $\pm$ 19,3 ^A	0,0232
T12	65,6 $\pm$ 30,4 ^{AB}	50,9 $\pm$ 33,8 ^B	68,7 $\pm$ 17,2 ^A	0,0121

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.3 EFEITO DOS DILUIDORES SOBRE A INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Neste tópico serão abordados os efeitos do diluidor sobre a preservação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial mitocondrial.

Na tabela 15 estão apresentados os resultados da porcentagem de células com membranas íntegra (plasmática e acrossomal) e alto potencial mitocondrial (PIAIA). É descrito por separado cada característica, seguindo a classificação clássica: membrana plasmática intacta (MPI, Tabela 16), membrana acrossomal intacta (MAI, Tabela 17) e alto potencial de mitocôndria (APM, Tabela 18), assim, torna possível diferenciar as lesões causadas pelo processo de refrigeração e o efeito isolado do diluidor sobre cada característica.

A porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIA) não apresentaram interação entre tempo e tratamento. No entanto, houve efeito do diluidor sobre a integridade das membranas. O diluidor SMT apresentou a porcentagem maior de PIAIA, valores intermediários foram encontrados no diluidor SMK, que por sua vez apresentou valores superiores ao diluidor BSAG.

Tabela 15 – Média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática e acrossomal intactas e alto potencial mitocondrial (PIAIA, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	69,53 $\pm$ 13,1	34,5 $\pm$ 12,6	57,7 $\pm$ 13,1	53,9 $\pm$ 12,9 ^A
T4	58,4 $\pm$ 16,2	24,0 $\pm$ 12,5	48,6 $\pm$ 17,9	43,7 $\pm$ 25,8 ^B
T8	50,8 $\pm$ 19,5	19,5 $\pm$ 9,6	45,6 $\pm$ 17,9	38,6 $\pm$ 15,7 ^B
T12	47,8 $\pm$ 18,8	25,0 $\pm$ 19,6	46,3 $\pm$ 18,8	39,7 $\pm$ 19,1 ^B
Média do diluidor	56,6 $\pm$ 18,7 ^a	25,8 $\pm$ 14,8 ^c	49,6 $\pm$ 18,6 ^b	-

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Foi encontrado efeito do diluidor sobre a integridade da membrana plasmática, sendo que os diluidores SMT e SMK foram os que melhor preservaram as membranas dos danos provocados pelo processo de refrigeração do sêmen comparados ao BSAG que apresentou uma redução considerável na porcentagem de células dessa categoria (Tabela 16). Observando o efeito do tempo, a porcentagem de MPI apresentou redução significativa quando se compara os valores do T0 com os do T12, já as médias e desvios padrão para T4, T8 e T12 não foram identificadas diferenças significativas.

Tabela 16 – Média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana plasmática intacta (MPI, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	75,3 $\pm$ 11,0	47,3 $\pm$ 16,7	64,3 $\pm$ 11,8	62,3 $\pm$ 17,5 ^A
T4	68,0 $\pm$ 18,3	35,7 $\pm$ 17,2	60,7 $\pm$ 19,7	54,5 $\pm$ 22,8 ^{AB}
T8	62,0 $\pm$ 20,5	43,2 $\pm$ 21,7	61,2 $\pm$ 20,3	55,4 $\pm$ 22,2 ^{AB}
T12	57,4 $\pm$ 22,5	37,2 $\pm$ 23,2	56,9 $\pm$ 19,2	50,5 $\pm$ 23,3 ^B
Média do diluidor	65,6 $\pm$ 19,3 ^a	40,8 $\pm$ 20,0 ^b	60,8 $\pm$ 17,8 ^a	

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

A porcentagem média de membrana acrossomal intacta (MAI) não diferiu entre os três diluidores estudados ($P = 0,5538$) e avaliados pelo Teste de Tukey (Tabela 17). Foram encontradas baixas porcentagens do dano a esta estrutura, sendo que o SMT apresentou um 5,4%, o BSAG um 5% e o SMK um 3,6%.

Tabela 17 – Média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com membrana acrossomal intata (MAI, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	94,4 $\pm$ 7,3	96,3 $\pm$ 3,2	95,9 $\pm$ 4,5	95,5 $\pm$ 5,2
T4	95,4 $\pm$ 4,0	94,6 $\pm$ 5,3	96,9 $\pm$ 3,4	95,6 $\pm$ 4,3
T8	94,1 $\pm$ 4,9	92,7 $\pm$ 7,5	96,2 $\pm$ 5,2	94,3 $\pm$ 6,0
T12	94,8 $\pm$ 6,8	96,3 $\pm$ 14,6	96,5 $\pm$ 3,7	95,8 $\pm$ 9,4
Média do diluidor	94,6 $\pm$ 5,8	95,0 $\pm$ 8,7	96,4 $\pm$ 4,2	-

Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Resultado semelhante ao observado para MPI foi obtido para o percentual de alto potencial mitocondrial, sendo que o BSAG foi o diluidor que menos preservou o potencial mitocondrial em relação ao SMT e SMK (Tabela 18). Por outro lado, a porcentagem de APM reduziu do T0 para o T4, se mantendo até T12.

Tabela 18 – Média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de células espermáticas com alto potencial mitocondrial (APM, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	74,8 $\pm$ 12,2	60,5 $\pm$ 12,4	65,6 $\pm$ 9,7	67,0 $\pm$ 12,7 ^A
T4	65,1 $\pm$ 15,0	46,6 $\pm$ 14,2	58,6 $\pm$ 18,3	56,6 $\pm$ 17,4 ^B
T8	59,3 $\pm$ 18,7	41,2 $\pm$ 13,8	53,8 $\pm$ 17,0	51,4 $\pm$ 18,0 ^B
T12	57,6 $\pm$ 18,2	44,5 $\pm$ 20,2	57,3 $\pm$ 15,8	53,1 $\pm$ 18,8 ^B
Média do diluidor	64,2 $\pm$ 17,3 ^a	48,2 $\pm$ 16,8 ^b	58,8 $\pm$ 15,2 ^a	

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote, 1991; BSAG: Adaptado de Gibb et al., 2011; SMK: Adaptado de Kenney et al., 1975

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.4 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

As alterações da morfologia espermática agrupadas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos de cauda estão apresentadas nas tabelas 19, 20 e 21, respectivamente. Também foram considerados os defeitos de peça intermediária (Tabela 22) e defeitos totais (Tabela 23). Os defeitos maiores dos espermatozoides são representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça subdesenvolvida, cauda enrolada na cabeça, cabeça isolada patológica, estreita na base, cabeça piriforme, cabeça pequena anormal e contorno anormal de cabeça), defeitos de peça intermediária (fibrilação, fratura total, fratura parcial, edema e pseudogotas), defeitos de cauda (cauda fortemente dobrada ou enrolada, cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa), além de defeitos de acrossoma, *pouch formation* e gota protoplasmática proximal.

Conforme o observado na tabela 19, os defeitos maiores são influenciados pelo efeito do diluidor ($P < 0,0001$), porém, não houve efeito do tempo de refrigeração ($P = 0,2223$) nas horas avaliadas no presente experimento (T0, T4, T8 e T12). Na análise de variância para o efeito de interação tempo x tratamento não foram achadas diferenças significativas ($P=0,0591$), mostrando uma tendência do diluidor BSAG a apresentar mais defeitos maiores em comparação ao diluidor SMT e SMK, que apresentaram valores menores e similares entre eles.

Tabela 19 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de defeitos maiores (DMA, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	28,3 $\pm$ 8,0	43,6 $\pm$ 11,7	31,7 $\pm$ 7,9	34,5 $\pm$ 9,2
T4	33,0 $\pm$ 8,4	41,9 $\pm$ 11,2	33,6 $\pm$ 8,9	36,2 $\pm$ 9,5
T8	33,9 $\pm$ 9,9	42,1 $\pm$ 9,8	32,5 $\pm$ 7,3	36,2 $\pm$ 9,0
T12	31,5 $\pm$ 8,3	41,3 $\pm$ 12,6	32,7 $\pm$ 9,9	35,2 $\pm$ 10,3
Média do diluidor	31,7 $\pm$ 8,7 ^b	42,2 $\pm$ 11,1 ^a	32,6 $\pm$ 8,4 ^b	

^{a,b} Letras diferentes, na linha, indicam diferença significativa ($P<0,05$) pelo teste de Tukey

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Os defeitos menores dos espermatozoides são representados pelas seguintes anomalias morfológicas: defeitos de cabeça (cabeça delgada, cabeça gigante, cabeça curta, cabeça larga, cabeça pequena normal, cabeça isolada normal), defeitos de implantação (abaxial, retroaxial, oblíqua), defeitos de cauda (cauda dobrada, cauda enrolada) e gota protoplasmática distal.

Como indicado na tabela 20, foi encontrada diferença significativa no efeito do tratamento ($P = 0,0214$), as porcentagens de defeitos oscilaram numericamente entre 10,9 e 7,7%, sendo que o maior valor de defeitos se evidenciou no diluidor SMT (10,9 $\pm$ 6,1%) e os menores valores foram para o diluidor BSAG (7,7 $\pm$ 4,4%). O diluidor SMK apresentou valores intermediários (9,5 $\pm$ 6,2%), não diferindo dos demais. Para o total de defeitos menores foram significativos os efeitos de tempo ($P<0,0001$) notando-se um decréscimo dos defeitos mais

pronunciados entre T0 e T4, a partir de 4 horas de refrigeração (T4) não foi notado declínio. Contudo, não houve efeito da interação tempo x tratamento ($P=0,1179$).

Tabela 20 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de defeitos menores (DME, %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	15,0 $\pm$ 7,2	10,1 $\pm$ 4,8	11,2 $\pm$ 6,8	12,1 $\pm$ 6,6 ^A
T4	10,5 $\pm$ 6,2	7,0 $\pm$ 3,4	8,0 $\pm$ 4,0	8,5 $\pm$ 4,8 ^B
T8	8,8 $\pm$ 4,9	6,6 $\pm$ 4,7	10,3 $\pm$ 7,8	8,6 $\pm$ 6,0 ^B
T12	9,4 $\pm$ 4,2	7,3 $\pm$ 4,2	8,6 $\pm$ 5,7	8,4 $\pm$ 4,7 ^B
Média do diluidor	10,9 $\pm$ 6,1 ^a	7,7 $\pm$ 4,4 ^b	9,5 $\pm$ 6,2 ^{ab}	

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p<0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna indicam diferença significativa ($p<0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

A porcentagem de ocorrência de defeitos de cauda (PCAU %) é apresentada na tabela 21. Nesta categoria estão incluídos os defeitos maiores de cauda (cauda fortemente dobrada ou enrolada e cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa) e os defeitos menores de cauda (cauda dobrada ou enrolada, cauda abaxial, retroaxial ou oblíqua e cauda com gota protoplasmática distal). A análise de variância mostrou que houve efeito do diluidor para esta característica ($P=<0,0001$), embora não houve efeito de interação entre tempo e tratamento ($P=0,7671$). Foi encontrado maior percentual de defeitos de cauda para o BSAG do que para SMT e SMK, ainda SMT apresentou maior incidência de defeitos de cauda do que SMK.

Tabela 21 – Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de defeitos de cauda (PCAU %) no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	20,1 $\pm$ 11,4	29,9 $\pm$ 14,2	18,1 $\pm$ 11,7	22,7 $\pm$ 12,4
T4	21,6 $\pm$ 12,7	26,7 $\pm$ 15,0	17,7 $\pm$ 11,0	22,0 $\pm$ 12,9
T8	19,6 $\pm$ 11,9	24,8 $\pm$ 16,4	18,0 $\pm$ 12,0	20,8 $\pm$ 13,4
T12	21,5 $\pm$ 12,6	26,8 $\pm$ 16,1	19,0 $\pm$ 13,2	22,4 $\pm$ 14,0
Média do diluidor	20,7 $\pm$ 12,2 ^b	27,1 $\pm$ 15,4 ^a	18,2 $\pm$ 12,0 ^c	

^{a, b} Letras diferentes, na linha, indicam diferença pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Não houve efeito de tratamento, tempo, nem interação entre tempo x tratamento ($P=0,3917$) para a incidência de lesões na peça intermediária (PPI) (Tabela 22).

Tabela 22 – Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de defeitos de peça intermediária (PPI %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	3,81 $\pm$ 3,0	3,3 $\pm$ 2,6	4,6 $\pm$ 4,2	3,9 $\pm$ 3,3
T4	3,3 $\pm$ 3,0	2,7 $\pm$ 2,5	4,0 $\pm$ 3,2	3,3 $\pm$ 2,9
T8	4,0 $\pm$ 3,2	3,5 $\pm$ 3,2	3,6 $\pm$ 3,1	3,7 $\pm$ 3,2
T12	3,7 $\pm$ 4,1	3,1 $\pm$ 3,7	3,3 $\pm$ 3,3	3,4 $\pm$ 3,7
Média do diluidor	3,7 $\pm$ 3,3	3,2 $\pm$ 3,0	3,9 $\pm$ 3,5	

Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

O total de defeitos espermáticos (DT) é dado pela somatória do total de defeitos maiores e do total de defeitos menores encontrados em um ejaculado. O percentual de defeitos totais encontrados no presente experimento não evidencia diferença estatística significativa depois de ser submetido à refrigeração ($P=0,2045$); porém, numericamente é notado que o valor de defeitos totais foi diminuindo a partir do tempo 0 até 12 horas (T12) de avaliação, este comportamento foi similar para os três diluidores (Tabela 23). Quando observado, o efeito do tratamento ($P<0,0001$) denotou que o diluidor BSAG apresentou maior valor de defeitos totais do que SMT e SMK.

Tabela 23 – Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de defeitos totais (DT, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	43,3 $\pm$ 11,3	53,7 $\pm$ 11,0	42,9 $\pm$ 13,0	46,6 $\pm$ 12,6
T4	43,5 $\pm$ 11,1	49,0 $\pm$ 12,3	41,6 $\pm$ 11,9	44,7 $\pm$ 12,0
T8	42,9 $\pm$ 12,5	48,8 $\pm$ 13,3	41,3 $\pm$ 11,3	44,3 $\pm$ 12,4
T12	41,0 $\pm$ 10,6	48,5 $\pm$ 13,4	41,3 $\pm$ 14,4	43,6 $\pm$ 12,8
Média do diluidor	42,6 $\pm$ 11,2 ^b	50 $\pm$ 12,4 ^a	41,8 $\pm$ 12,4 ^b	

^{a, b} Letras diferentes, na linha, indicam diferença pelo teste de Tukey ($P<0,05$)

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.5 INTEGRIDADE DA ESTRUTURA DA CROMATINA

A integridade da cromatina foi avaliada pela porcentagem de células condensadas, pela técnica de azul de toluidina como descrito nos materiais e métodos. As células foram classificadas em três grupos: espermatozoides condensados (ATI), espermatozoides intermediários (ATII) e espermatozoides descondensados (ATIII). Os espermatozoides com a

cromatina condensada (ATI) não apresentaram efeito do tempo. Os valores para os tempos de avaliação de 0, 4, 8 e 12 horas foram $94,9 \pm 6,2$; $95,5 \pm 6,0$; $94,5 \pm 6,0$; $92,2 \pm 14,7\%$, respectivamente. As amostras apresentaram alto grau de condensação da cromatina sem ter efeito significativo do diluidor ($P=0,3676$), os valores encontrados de ATI nos diluidores SMT, BSAG e SMK foram, respectivamente, os seguintes $94,6 \pm 6,0$; $94,4 \pm 6,5$; $93,8 \pm 13,0\%$, conforme descrito na tabela 24.

Tabela 24 – Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de espermatozoides com cromatina normalmente condensada (ATI, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	$94,32 \pm 6,8$	$95,1 \pm 6,2$	$95,4 \pm 6,0$	$94,9 \pm 6,2$
T4	$95,1 \pm 5,8$	$95,4 \pm 5,8$	$95,9 \pm 5,3$	$95,5 \pm 6,0$
T8	$94,3 \pm 5,4$	$93,7 \pm 7,7$	$95,7 \pm 4,7$	$94,5 \pm 6,0$
T12	$94,8 \pm 4,93$	$93,5 \pm 6,8$	$88,4 \pm 24,2$	$92,2 \pm 14,7$
Média do diluidor	$94,6 \pm 6,0$	$94,4 \pm 6,5$	$93,8 \pm 13,0$	

Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Importante notar que a cromatina espermática apresenta um índice baixo de alteração e que é estável ao processo de refrigeração como descrito nas tabelas 25 e 26 para os espermatozoides intermediários ATII e espermatozoides descondensados ATIII. Além de não ser encontrado efeito do tempo, efeito do diluidor, nem efeito da interação entre tempo e tratamento para os três tipos de células estudados.

Tabela 25 – Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de espermatozoides com cromatina moderadamente descondensada (ATII, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	4,1 $\pm$ 4,1	3,7 $\pm$ 4,5	3,6 $\pm$ 4,1	3,8 $\pm$ 4,1
T4	4,0 $\pm$ 4,4	3,6 $\pm$ 4,4	3,0 $\pm$ 3,5	3,5 $\pm$ 4,6
T8	4,1 $\pm$ 3,6	4,5 $\pm$ 5,3	3,4 $\pm$ 3,4	4,0 $\pm$ 4,1
T12	3,9 $\pm$ 3,7	5,0 $\pm$ 4,7	3,9 $\pm$ 4,0	4,3 $\pm$ 4,1
Média do diluidor	4,0 $\pm$ 4,3	4,2 $\pm$ 4,7	3,5 $\pm$ 3,7	

Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Tabela 26 – Médias $\pm$ desvios padrão de porcentagem de espermatozoides com cromatina descondensada (ATIII, %), no sêmen equino diluído em três diluidores (SMT, BSAG e SMK) e refrigerado até 12 horas a 5° C, Pirassununga – 2013

Tempo	Diluidores			Média do tempo
	SMT	BSAG	SMK	
T0	1,6 $\pm$ 2,7	1,2 $\pm$ 1,8	1,1 $\pm$ 2,0	1,3 $\pm$ 2,2
T4	0,9 $\pm$ 1,6	1,0 $\pm$ 1,6	1,1 $\pm$ 1,9	1,0 $\pm$ 1,6
T8	1,6 $\pm$ 2,1	1,8 $\pm$ 2,9	1,0 $\pm$ 1,4	1,4 $\pm$ 2,2
T12	1,3 $\pm$ 1,55	1,5 $\pm$ 2,4	1,5 $\pm$ 2,1	1,4 $\pm$ 1,95
Média do diluidor	1,3 $\pm$ 2,0	1,4 $\pm$ 2,2	1,1 $\pm$ 1,9	

Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas após a refrigeração; T8 – 8 horas após a refrigeração; T12 – 12 horas após a refrigeração

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.6 EFEITO DA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO A 5° C POR 12 HORAS

Para avaliar o efeito da refrigeração sobre a célula espermática utilizou-se os valores encontrados no sêmen *in natura* e no tempo 12 horas de refrigeração.

Os resultados da interação entre sêmen *in natura* e tempo 12 horas serão apresentados em tabelas com as médias, desvios padrão e o valor do P. Quando o resultado teve efeito estatístico significativo, os dados foram também apresentados em gráfico para facilitar a visualização do efeito.

6.6.1 Efeito da refrigeração por 12 horas sobre os parâmetros da cinética espermática

Conforme notado na tabela 27, o processo de refrigeração de sêmen afetou negativamente a motilidade espermática total nas 12 horas de estoque a 5°C (P=0,0002), provocando uma redução desta característica quando comparado ao sêmen *in natura*. A melhor eficiência foi observada para os diluidores SMK e SMT, que não apresentaram diferença na motilidade total quando comparado com o sêmen *in natura*. Já para o diluidor BSAG observou-se uma queda de 24,7% do valor desta característica avaliada (Gráfico 1). Em relação à motilidade progressiva ocorreu um comportamento semelhante, os valores nesta mesma tabela indicam que houve diferença entre o BSAG e o sêmen *in natura*, não havendo diferença entre o sêmen *in natura* e o SMT e SMK.

Tabela 27 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com Motilidade total (MT%) e Motilidade progressiva (MPRO, %) no sêmen *in natura* e após 12 horas (T12) de refrigeração utilizando três diluidores, Pirassununga – 2013

Variáveis	<i>in natura</i>	T12 horas			Valor do P
		SMT	BSAG	SMK	
MT ¹ (%)	84,3 $\pm$ 10,9 ^A	73,4 $\pm$ 27,7 ^{AB}	59,6 $\pm$ 43,2 ^B	77,8 $\pm$ 13,4 ^A	0,0002
MPROG ² (%)	28,9 $\pm$ 9,1 ^A	22,9 $\pm$ 12,5 ^{AB}	16,7 $\pm$ 9,0 ^B	27,1 $\pm$ 8,4 ^A	0,0007

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05) pelo teste Tukey

MT¹: Motilidade total; MPROG²: motilidade progressiva.

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Quanto às médias e desvios padrão das características quantitativas da cinética espermática (VAP, VSL e VCL), com a refrigeração não foi achada diferença estatística (Tabela 28).

Tabela 28 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com Velocidade de trajeto (VAP); Velocidade progressiva (VSL); Velocidade curvilínea (VCL). no sêmen *in natura* e no tempo 12 horas (T12) e utilizando três diluidores para refrigeração, Pirassununga – 2013

Variáveis	<i>in natura</i>	T12 horas			Valor do P
		SMT	BSAG	SMK	
VAP ¹ ($\mu\text{m/s}$)	123,7 $\pm$ 25,7	127,1 $\pm$ 38,0	111,0 $\pm$ 41,7	114,5 $\pm$ 14,8	0,1656
VSL ² ($\mu\text{m/s}$)	74,9 $\pm$ 17,2	76,3 $\pm$ 22,9	65,7 $\pm$ 16,3	69,9 $\pm$ 11,0	0,1445
VCL ³ ($\mu\text{m/s}$)	225,8 $\pm$ 56,9	237,8 $\pm$ 71,9	204,5 $\pm$ 84,4	220,2 $\pm$ 29,2	0,1872

Não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$).

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

Seguindo o comportamento das características acima descritas, os valores para o ALH, BCF, STR e LIN apresentaram igualdade estatística após as 12 horas de refrigeração (Tabela 29), contudo a porcentagem de células RAP apresentou uma queda significativa quando foi adicionado o diluidor BSAG.

Tabela 29 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com Amplitude lateral da cabeça (ALH); Frequência de batimento flagelar (BCF), Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) e espermatozoides rápidos (RAP) no sêmen *in natura* e no tempo 12 horas (T12) e utilizando três diluidores para refrigeração, Pirassununga – 2013

Variáveis	<i>in natura</i>	T12 horas			Valor do P
		SMT	BSAG	SMK	
ALH (μm)	7,6 $\pm$ 2,2	7,6 $\pm$ 2,2	7,0 $\pm$ 2,2	7,7 $\pm$ 0,8	0,4260
BCF (Hz)	37,4 $\pm$ 5,6	36,3 $\pm$ 5,4	34,9 $\pm$ 2,9	37,3 $\pm$ 2,2	0,2486
STR (%)	59,9 $\pm$ 6,1	61,6 $\pm$ 8,1	62,6 $\pm$ 10,6	61,3 $\pm$ 6,4	0,7094
LIN (%)	35,9 $\pm$ 6,1	35,5 $\pm$ 6,8	39,7 $\pm$ 11,7	34,2 $\pm$ 4,9	0,3612
RAP (%)	76,4 $\pm$ 15,5 ^A	65,6 $\pm$ 30,4 ^{AB}	49,9 $\pm$ 34,1 ^B	68,7 $\pm$ 17,2 ^A	0,0006

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p<0,05$) pelo teste Tukey

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.6.2 Efeito da refrigeração por 12 horas sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de mitocôndria

Como descrito na tabela 30, a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossoma intato e alto potencial de mitocôndria (PIAIA) foi baixa no sêmen *in natura* ($50,0 \pm 20,5\%$), e não variou quando diluído no SMT ($47,8 \pm 18,8\%$), nem para o SMK ($46,3 \pm 18,8\%$) após as 12 horas de refrigeração. Embora esta característica tenha sido reduzida pela metade quando comparado com o BSAG ($25,0 \pm 19,6\%$). Observou-se no gráfico 4 os índices individualizados para a porcentagem de células PIAIA. Nesta mesma tabela observam-se os valores de médias $\pm$ desvios padrão e os valores do P, para células com membrana plasmática intacta (MPI), células com membrana acrossomal intacta (MAI) e células com alto potencial de mitocôndria (APM), sendo que MAI não diferiu entre os tratamentos, nem sofreu efeito da refrigeração, por outro lado MPI e APM se comportaram de forma semelhante ao PIAIA.

O BSAG foi ineficiente na preservação da membrana plasmática intacta (MPI, %) após as 12 horas de refrigeração, apresentando uma queda de 23,3%, diferindo do SMT e do SMK os quais não tiveram diferença significativa em comparação com o sêmen *in natura*.

Também foram observados os efeitos da refrigeração sobre a categoria de células com alto potencial de membrana mitocondrial (APM, %), sendo reduzida a porcentagem destas células com o BSAG quando comparado ao sêmen *in natura*. Os outros diluidores (SMT e SMK) foram similares ao sêmen *in natura*. A redução do potencial de mitocondrial encontrada foi de 11,8%, 24,9% e 12,1% para os diluidores SMT, BSAG e SMK respectivamente.

Tabela 30 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossoma íntata e alto potencial mitocondrial (PIAIA), células com membrana plasmática íntata (MPI), membrana acrossomal íntata (MAI), e alto potencial mitocondrial, no sêmen *in natura* e após 12 horas (T12) e utilizando três diluidores para refrigeração, Pirassununga – 2013

Variáveis	<i>in natura</i>	T12 horas			Valor do P
		SMT	BSAG	SMK	
PIAIA (%)	50,0 $\pm$ 20,5 ^A	47,8 $\pm$ 18,8 ^A	25,0 $\pm$ 19,6 ^B	46,3 $\pm$ 18,8 ^A	0,0002
MPI (%)	60,5 $\pm$ 20,5 ^A	57,4 $\pm$ 22,5 ^A	37,2 $\pm$ 23,2 ^B	56,9 $\pm$ 19,2 ^A	0,0020
MAI (%)	91,4 $\pm$ 7,0	94,8 $\pm$ 6,8	96,3 $\pm$ 14,6	96,5 $\pm$ 3,7	0,3513
APM (%)	69,4 $\pm$ 15,0 ^A	57,6 $\pm$ 18,2 ^{AB}	44,5 $\pm$ 20,2 ^B	57,3 $\pm$ 15,8 ^{AB}	0,0003

^{A,B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey.

PIAIA¹: células com membrana plasmática íntata, acrossoma íntato e alto potencial de mitocôndria; MPI²: Células com membrana plasmática íntata; APM³ células com alto potencial de mitocôndria.

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.6.3 Efeito da refrigeração por 12 horas sobre as alterações da morfologia espermática

As porcentagens médias e desvios padrão das alterações da morfologia espermática estão descritas na tabela 31. Foram descritas as alterações da cabeça (PCAB); alterações da peça intermediária (PPI); alterações de cauda (PCAU); *Pouch formation* (POUCH); Defeitos maiores (DMA); Defeitos menores (DME) e Defeitos totais (DT).

Para os defeitos maiores (DMA) os espermatozoides diluidores no BSAG resultaram em um aumento deste percentual em comparação com o sêmen *in natura*, e os diluidores SMT e MSK que não tiveram efeito das 12 horas de refrigeração para esta característica estudada.

Os defeitos totais (DT, %) encontrados no sêmen *in natura* (36,1 $\pm$ 9,65%) não diferiram entre o sêmen *in natura* e os diluidores SMT e MSK, no entanto o sêmen diluído em BSAG apresentou um aumento desta característica.

Os defeitos de cabeça (PCAB) apresentaram redução após 12 horas de refrigeração no diluidor SMT comparado ao sêmen *in natura*. Os outros diluidores (BSAG e SMK) não

apresentaram diferença quando comparados ao *in natura*. Em relação aos defeitos de cauda (PCAU) a refrigeração promoveu um aumento neste percentual nos três diluidores.

Tabela 31 – Médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de espermatozoides com alteração morfológica, no sêmen *in natura* e após 12 horas (T12) de refrigeração a 5° C utilizando três diluidores, Pirassununga – 2013

Variáveis	<i>in natura</i>	T 12 horas			Valor do P
		SMT	BSAG	SMK	
PCAB ¹	21,5 $\pm$ 9,38 ^A	15,8 $\pm$ 7,0 ^B	18,6 $\pm$ 8,0 ^{AB}	18,9 $\pm$ 7,2 ^{AB}	0,0018
PPI ²	2,9 $\pm$ 2,47	3,7 $\pm$ 4,1	3,1 $\pm$ 3,7	3,3 $\pm$ 3,3	0,6060
PCAU ³	11,7 $\pm$ 6,38 ^C	21,5 $\pm$ 12,6 ^{AB}	26,8 $\pm$ 16,1 ^A	19,0 $\pm$ 13,2 ^B	<0,0001
POUCH ⁴	9,9 $\pm$ 6,53	7,5 $\pm$ 5,4	10,2 $\pm$ 5,6	8,9 $\pm$ 4,7	0,0641
DMA ⁵	27,3 $\pm$ 6,05 ^B	31,5 $\pm$ 8,3 ^B	41,3 $\pm$ 12,6 ^A	32,7 $\pm$ 9,9 ^B	<0,0001
DME ⁶	9,3 $\pm$ 5,74	9,4 $\pm$ 4,2	7,3 $\pm$ 4,2	8,6 $\pm$ 5,7	0,3212
DT ⁷	36,1 $\pm$ 9,65 ^B	41,0 $\pm$ 10,6 ^B	48,5 $\pm$ 13,4 ^A	41,3 $\pm$ 14,4 ^B	<0,0001

^{A, B}: Letras diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste Tukey

PCAB¹: patologias da cabeça; PPI²: Patologias da peça intermediária; PCAU³: Patologias de cauda; POUCH⁴: Pouch formation; DMA⁵: Defeitos maiores; DME⁶: Defeitos menores; DT⁷: Defeitos totais.

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

6.6.4 Efeito da refrigeração por 12 horas sobre a estrutura da cromatina espermática

Conforme na tabela 32, pode ser notado o efeito do processo de refrigeração ($P=0,0357$) de sêmen equino a 5° C ao longo das 12 horas nos três diluidores usados sobre a porcentagem de células classificadas com cromatina normal (ATI) e as células com cromatina moderadamente descondensada (ATII) ($P=0,0209$). Em comparação ao sêmen *in natura*. No entanto, não foram encontradas mudanças na porcentagem de células altamente descondensadas (ATIII).

Fazendo uma comparação da integridade da cromatina para o sêmen *in natura* e 12 horas após o processo de refrigeração, foi detectado no BSAG menor porcentagem de células classificadas com cromatina normal (ATI). Com respeito aos outros diluidores, não houve diferença entre a porcentagem de células com cromatina normal (ATI) quando comparados com o sêmen *in natura* no tempo 12 horas (T12) após a refrigeração.

É observado que as células com cromatina moderadamente descondensada (ATII) aumentaram quando utilizado o BSAG em comparação ao sêmen *in natura*. Já para o SMT e o SMK não houve diferença significativa.

Tabela 32 – Médias $\pm$ desvios padrão da alteração da cromatina espermática (%) para o sêmen *in natura* e após 12 horas (T12) de refrigeração utilizando três diluidores, Pirassununga – 2013

Variáveis	<i>in natura</i>	T12 horas			Valor geral do P
		SMT	BSAG	SMK	
ATI	96,6 $\pm$ 4,9 ^A	94,8 $\pm$ 5,0 ^{AB}	93,5 $\pm$ 6,8 ^B	94,6 $\pm$ 5,7 ^{AB}	0,0357
ATII	2,6 $\pm$ 3,2 ^B	3,9 $\pm$ 3,7 ^{AB}	5,0 $\pm$ 4,7 ^A	3,9 $\pm$ 4,0 ^{AB}	0,0209
ATIII	0,9 $\pm$ 1,9	1,2 $\pm$ 1,6	1,5 $\pm$ 2,4	1,5 $\pm$ 2,1	0,5472

^{A, B:} Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

ATI= Cromatina normal; ATII= Cromatina moderadamente descondensada; ATIII= Cromatina altamente descondensada.

SMT: Adaptado de Padilla e Foote (1991); BSAG: Adaptado de Gibb et al. (2011); SMK: Adaptado de Kenney et al. (1975)

Fonte: (FLOREZ-RODRIGUEZ, 2013).

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Muitos diluidores têm sido usados para refrigeração e armazenamento de sêmen equino, principalmente para ser transportado e utilizado em outros locais para inseminação artificial (IA) das éguas. Este procedimento é importante para prolongar a longevidade do espermatozoide, melhorar a fertilidade, prover um meio antibiótico e permitir um volume apropriado para ser utilizado (PICKETT et al., 1975).

Dependendo do diluidor usado durante o processo de refrigeração, a célula espermática pode ser beneficiada quanto à preservação da motilidade, integridade do acrossoma e DNA, especialmente para equinos que apresentam substancialmente diminuição da motilidade quando processado de uma maneira convencional, por diluição simples do plasma seminal com o diluidor de sêmen (FERRER et al., 2012).

Na literatura, encontram-se publicações do uso de diluidores com diferentes componentes e seus efeitos sobre o espermatozoide, tendo como estimativa de qualidade unicamente a motilidade espermática. Embora vários diluidores e dispositivos de armazenamento tenham sido testados, um método confiável para preservar a fertilidade do sêmen durante períodos de tempo mais longos de armazenamento refrigerado não se desenvolveu ainda (AURICH, 2008).

O experimentou propor-se produzir um diluidor para conservação de sêmen equino refrigerado a 5°C que melhore a eficiência do processo de refrigeração e qualidade do sêmen, para aplicação na IA a campo e em outras técnicas de reprodução assistida (ARTs).

Os resultados obtidos das características espermáticas estudadas (cinética espermática, integridade de membranas e cromatina e alterações da morfologia espermática) das quatro colheitas realizadas nos quatro garanhões (Comander, Grafite, Jurh e Narai) foram analisadas em três partes. Na primeira parte foram apresentados os dados das médias e desvios padrão do sêmen *in natura*, esta informação deu uma noção da qualidade espermática inicial de cada animal, não objetivando a comparação entre garanhões, mas verificar a variabilidade entre os ejaculados utilizados. Na segunda parte foram comparadas as médias e desvios padrão do sêmen refrigerado a 5°C nos três diluidores (SMT, BSAG e SMK) a cada 4 horas até 12 horas (T0, T4, T8 e T12). Na terceira parte foram avaliados os efeitos totais do processo de refrigeração (diluição e refrigeração a 5° C/12horas) em relação ao sêmen *in natura* nos diferentes diluidores.

De um modo geral, é possível observar no presente experimento, que as variáveis estudadas no sêmen *in natura* dos quatro garanhões tiveram diferenças individuais significativas, o que coincide com achados da maioria de pesquisas com sêmen equino (AZIZ; ENBERGS, 2012; ANDRADE et al., 2011; GARCÍA et al., 2011; WEBB et al., 2009).

Uma das características mais conhecidas e reportadas do sêmen equino é a variabilidade nos parâmetros físicos entre indivíduos, bem como entre ejaculados do mesmo indivíduo, apresentando resultados de fertilidade inconstantes e insatisfatórios com o uso de semen refrigerado, o qual é uma limitação importante para o avanço da biotecnologia e uso do sêmen processado na indústria equina (SAMPER; MORRIS, 1998),

Em equinos com pobre qualidade do sêmen após a refrigeração, diferentes diluidores devem ser testados para encontrar uma ótima combinação dos componentes do meio para cada indivíduo (AURICH, 2008).

Nos seguintes itens é comparada a eficiência dos diferentes diluidores na manutenção dos parâmetros da cinética espermáticas avaliadas pelo CASA; seguido dos efeitos dos diluidores sobre a integridade da membrana plasmática, acrossomal e potencial de mitocôndria; e posteriormente as alterações da morfologia espermática e cromatina espermática.

7.1 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA CINÉTICA ESPERMÁTICA

Segundo a análise computadorizada da motilidade espermática, em geral, os resultados mostram que o diluidor SMT foi superior ao diluidor SMK quando observados os parâmetros de velocidade espermática e, pelo contrario, o diluidor BSAG foi o pior na preservação das motilidades em comparação a os outros dois diluidores. No entanto, nas velocidades e qualidade do movimento espermático o BSAG teve um comportamento similar ao SMK. O valor mais alto de linearidade (LIN) foi encontrado no diluidor BSAG.

Segundo Lefrapper, Walston e Whisnant (2010), a manutenção de uma maior motilidade não significa, necessariamente, uma maior fertilidade, mas é uma medida relativamente simples, que pode servir como um guia para a avaliação do sêmen armazenado.

A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozóides é importante devido ao fato da cinética espermática ter relevância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozóides (ARRUDA, 2000).

7.1.1 Motilidade Total (MT) e Motilidade progressiva (MPROG)

A motilidade total (MT), expressa em porcentagem, é a razão das células móveis na concentração espermática total. A motilidade progressiva (MPROG), expressa em porcentagem, é a razão das células móveis com movimento progressivo na concentração espermática total (ARRUDA, 2000). São muito utilizadas como indicadores da qualidade da célula espermática, sendo um componente de rotina no exame andrológico do garranhão (FOSTER et al., 2011).

Quando se avaliou o efeito de interação entre tempo de refrigeração e diluidor, observou-se que no tempo 0 (T0) os três diluidores apresentaram valores similares de motilidade total (MT). Provavelmente 5 minutos após a diluição não foram suficientes para que a célula espermática esgotará as reservas internas que mantem sua movimentação. Os espermatozoides usam suas reservas intracelulares de plasmalogênio para fornecer energia numa base a curto prazo (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Já às quatro horas o BSAG foi inferior ao SMT e similar ao SMK. Às 8 e 12 horas da refrigeração houve uma queda maior da motilidade apresentando diferença significativa para o SMT e o SMK. Depois das 8 horas do tempo de refrigeração, o comportamento do SMT e o SMK foi similar, eles apresentaram uma queda mínima sem diferencia significativa com o sêmen *in natura*.

A diminuição da motilidade pode ser explicado em termos de mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática e na região da cauda, é também que possível alteração da disponibilidade de energia ou danos aos elementos axonemal poderia contribuir para o declínio (WATSON, 1995). O declínio na motilidade pode ser reversível e pode, portanto, representar uma medida fisiológica em vez de uma mudança unicamente patológica (ALGHAMDI et al., 2009). Quando armazenado por períodos mais longos, a motilidade, velocidade e capacidade de fertilização diminuem drasticamente (MORAN et al., 1992).

Conforme notado, a média da motilidade espermática (MT) do sêmen no tempo 0 horas foi similar para todos os diluidores com valores de 85,4%, 82,4% e 80,3% para o SMT, BSAG e SMK respectivamente, valores que foram superiores à motilidade total reportada por Lefrapper, Walston e Whisnant (2010), utilizando o diluidor Kenney (73,4±4,2%).

Embora a motilidade progressiva (MPROG) para o SMT e SMK (29,2±5,9% e 35,6±9,8%, respectivamente) foi baixa quando comparado a outras pesquisa. Por exemplo, Lefrapper, Walston e Whisnant (2010), avaliando diferentes diluidores comerciais

encontraram valores de $41,7 \pm 4,3\%$ para o diluidor Kenney (leite desnatado e glicose) e $50,5 \pm 5,8\%$ para o INRA 96 (base de fosfocaseinato, glicose, lactose), segundo o reportado pelos autores, quando utilizados componentes definidos da caseína na refrigeração de sêmen a 4°C é melhor a manutenção da motilidade progressiva.

Os espermatozoides preservados no diluidor SMT e SMK exibiram uma porcentagem alta da motilidade total 12 horas após a refrigeração ($73,4 \pm 27,7$ e $77,8 \pm 13,4\%$), respectivamente. Este valor de MT foi similar ao sêmen *in natura*. Ao contrario no BSAG o porcentual de MT diminuiu consideravelmente, apresentando uma queda de $24,7\%$, sugerindo que esse parâmetro de qualidade seminal é influenciado pelos componentes do meio de refrigeração, sendo que foi bem preservado quando utilizado diluidores com presença do leite desnatado. Outros autores têm indicado que a presença dos componentes do leite desnatado protege a célula espermática de mudanças bruscas mantendo a motilidade total e progressiva (BATELLIER et al., 1997; MANJUNATH, 2012).

Resultado similar da motilidade espermática ($71,7 \pm 12,4\%$) foi reportado por Ramires Neto et al. (2012) para sêmen diluído 1:1 com diluidor comercial a base de leite desnatado (Botu-sêmen®, Botupharma – SP, Brasil). Vários autores tem mostrado que a suplementação do diluidor a base de leite com o meio Tyrode podem melhorar a motilidade pos-armazenamento de alguns ganhões (WEBB et al., 2009; PADILLA; FOOTE, 1991).

Espermatozoides mantidos a 5°C não exibem diferença da motilidade e velocidades espermáticas quando usados diferentes diluidores pelo menos durante 24 a 48 horas de armazenagem (BRUEMMERT et al., 2002), esta afirmação caberia no caso de ser usados ganhões “good coolers”.

Em outra pesquisa o decréscimo das motilidades durante a armazenagem do sêmen refrigerado a 5°C , utilizando um diluidor a base de leite desnatado, apresentou o declínio mais acentuado a partir de 48 horas da refrigeração (RAPHAEL et al., 2008).

Também Lefrapper, Walston, Whisnant (2010), analisaram a motilidade de sêmen equino em 6 diferentes diluidores comerciais nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas e reportaram que a motilidade diminui sobre o tempo, obtendo resultados aceitáveis até às 24 horas, tempo que é recomendado para inseminação artificial de sêmen refrigerado.

A respeito da composição dos diluidores utilizados no experimento, eles contém em comum uma fonte energética de glicose, sendo de 49 mg/mL para o SMK, $31,85 \text{ mg/mL}$ para o BSAG e o SMT. Com respeito aos outros componentes energeticos dos diluidores, a concentração de piruvato ($0,0385 \text{ mg/mL}$) foi igual para o SMT e BSAG e o conteúdo de lactato de sódio no diluidor SMT e BSAG ($1,085 \text{ } \mu\text{L/mL}$) foi o mesmo. Esses dois

componentes foram incluídos como fontes energéticas adicionais, excepto para o SMK. O lactose presente nos diluidores a base de leite (SMK e SMT) também é incluído como fonte energética.

Extensores com uma composição semelhante à da formula original publicado por Kenney et al. (1975) são mais populares e utilizados no mundo inteiro. Estes extensores são baratos, fáceis de preparar, podem ser armazenadas na forma congelada e resultar em taxas de fertilidade aceitáveis (AURICH, 2008).

Os espermatozoides usam uma variedade de substratos e a traves de processos catabolicos convertem a maioria da energia em ATP. Os açucares permitem a sobrevivência dos espermatozoides sob condições anaeróbicas, como durante a estocagem do sêmen para utilização em inseminação artificial. Grande parte do ATP é utilizado para o processo de motilidade espermática, e outra parte é usada para manter a integridade dos processos ativos de transporte de membranas, impedindo a perda de componestes iônicos vitais para a célula espermática (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Outros componentes do diluidor foram estudados por Webb e Arns. (2006) baseados em resultados de experimentos, relataram que os efeitos do piruvato e do lactato servem como substratos energéticos disponíveis e não tem função antioxidante, assim os espermatozoides podem usar o lactato para produzir ATP necessário para manter o movimento flagelar.

O piruvato adicionado ao diluidor à base de leite desnatado resulta em uma melhora da motilidade pós-armazenagem, em uma concentração de 2 mmol/L é apropriado para uso no diluidor de sêmen equino (WEBB; ARNS, 2006; BRUEMMERT et al., 2002)

Neste sentido, Lefrapper, Walston, Whisnant, (2010), relataram que os extensores para sêmen equino encontrados no mercado a base de leite, diferem na composição de açúcar e do antibiótico utilizado. O tipo de antibiótico pode afetar a motilidade espermática, mas vai depender do nível usado no diluidor.

A presença de leite desnatado no SMK e SMT (100% ou 65%) preservaram as características da cinética espermática durante 12 horas a 5°C comparável ao sêmen *in natura*. Sugerindo que o leite é um componente principal irremovível do diluidor que protege eficientemente, mas a eficiência pode ser obtida mesmo com a redução de um 35%.

Amann e Pickett (1987) e Moran et al. (1992) relataram que as injúrias do processo de refrigeração eram caracterizadas por um padrão anormal de motilidade, perda da rapidez espermática, danos nas membranas espermáticas e redução do metabolismo devido a perda de enzimas e outros componentes intracelulares.

Baseados em pesquisas, Varner (2008) relata que a motilidade dos espermatozoides não fornece o poder de discriminação absoluta, enfatizando que outros atributos espermáticos além da motilidade desempenham papéis críticos na capacidade de fertilização dos espermatozoides.

7.1.2 Velocidade progressiva (VSL), Velocidade curvilinear (VCL) e Velocidade de trajeto (VAP)

A VSL, expressa em $\mu\text{m/s}$, é a distância considerando-se uma linha reta entre o ponto inicial e o ponto final da trajetória dividido pelo tempo decorrido (ARRUDA, 2000). O valor de VSL ($\mu\text{m/s}$) foi diferente entre tratamentos unicamente no tempo 0 (T0), sendo que o SMT foi superior aos outros diluidores. A avaliação no tempo 12 horas (T12) não apresenta diferença entre o sêmen refrigerado e o sêmen *in natura*.

Diferentemente, o valor do VSL foi menor no tempo 0 horas e aumentou 24 horas de armazenado e declinou das 48 às 72 horas, isso para seis diluidores comerciais analisados por Lefrapper, Walston e Whisnant (2010). Neste caso o aumento entre as 0 e 24 horas na maioria dos diluidores, foi talvez por causa dos componentes energéticos presentes no diluidor.

A velocidade curvilinear (VCL) referente à velocidade média expressa em $\mu\text{m/s}$ da distância total entre cada posição do centro da célula durante a captura da imagem, dividida pelo tempo decorrido ou a distância percorrida pelo espermatozoide ao longo do seu caminho curvilinear, é calculada pela somatória das distâncias ao longo da trajetória e então corrigida pelo tempo (ARRUDA, 2000).

O valor de VCL apresentou diferença entre os tratamentos nos tempos 0 horas (T0) e 4 horas (T4). Com respeito a este parâmetro, no (T0) obtiveram-se os valores mais altos no diluidor SMT para a velocidade curvilinear ($284,5 \pm 53,9 \mu\text{m/s}$) com diferença significativa para o BSAG ($214 \pm 57,6 \mu\text{m/s}$) e o SMK ($188,7 \pm 35,0 \mu\text{m/s}$). Após as 4 horas de refrigeração o valor do VCL aumentou no BSAG ($222,4 \pm 77,9 \mu\text{m/s}$), porém ainda o SMT foi superior. De acordo com Lefrapper, Walston e Whisnant (2010), este incremento do VCL pode indicar perda de viabilidade da célula espermática.

Vidament et al. (2012), relatam sêmen armazenado durante 22 horas a baixas temperaturas (5°C sem exposição ao ar e 15°C com exposição ao ar), não sofrem modificações dos parâmetros da motilidade, mas o VCL e ALH aumentaram.

A velocidade de trajeto (VAP) expressa em $\mu\text{m/s}$, corresponde à velocidade média ininterrupta do caminho da célula, sendo a indicação do comprimento da trajetória geral do espermatozoide e é calculada encontrando o comprimento do caminho médio corrigido pelo tempo. Esse algoritmo é usado para reduzir os efeitos da amplitude e deslocamento lateral de cabeça, obtendo-se uma trajetória mais representativa da posição espermática ao longo do movimento (ARRUDA, 2000). Igualmente, o VAP apresentou diferença entre tratamentos nos tempos 0 horas (T0) e 4 horas (T4). Neste caso, o SMK apresentou valores significativamente inferiores aos BSAG e SMT. Foi descrito por Aziz e Enbergs (2012) que a diferença na relação sódio: potássio entre os diluidores pode ser a principal causa de redução dos parâmetros espermáticos imediatamente após a diluição.

A determinação da qualidade seminal preservada pelos diferentes diluidores, quando foram avaliadas somente motilidade total e progressiva, pode variar em comparação a uma avaliação mais detalhada das características do movimento espermático. Como visto no presente experimento, o diluidor SMK apresentou o melhor valor de motilidade progressiva, mas não foi o melhor na manutenção das características de velocidade espermática, sugerindo que estes valores não estão relacionados ou que eles medem comportamentos diferentes da célula espermática.

Comparando-se os valores do VSL do presente experimento com os achados por Lefrapper, Walston e Whisnant (2010) é observado que no tempo 12 horas (T12) os valores do SMT, BSAG e SMK foram maiores a os valores reportados no tempo 0 horas (T0) dos diluidores comerciais KENNEY[®], EZ MIXIN[®], EQUIPRO[®], INRA[®] e outros avaliados naquela pesquisa.

Durante o processo de refrigeração e armazenagem do sêmen equino pode surgir uma sequência de alterações das características do movimento espermático. Em uma primeira fase, após a adição do diluidor, mudanças no movimento são consideradas características da adaptação das células espermáticas a nova condição ambiental. Numa segunda fase, uma subpopulação de espermatozoides (mais susceptíveis) pode ter os seus parâmetros de motilidade modificados, de movimentos coordenados para não coordenados (movimentos laterais fortes e menos progressivos), levando a um aumento do ALH, VCL e sem causar alteração ao VAP. Em seguida, numa terceira fase, esta apresenta uma subpopulação com redução muito forte da motilidade, levando à redução da motilidade total (VIDAMENT et al., 2012).

Os valores de velocidade espermática foram maiores quando adicionadas concentrações de piruvato (2 mM) ao meio diluente à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen a

5°C, pela ação antioxidante do piruvato, ele preserva melhor as características da cinética espermática e leva a menor peroxidação lipídica, que tem sido reportado como a causa principal de perda da motilidade espermática (BRUEMMERT et al., 2002). O piruvato tem sido adicionado ao diluidor de sêmen como substrato energético a uma concentração de 0.02 mM (BAVISTER et al., 1969). No presente experimento o diluidor SMT a base de leite desnatado e suplementado com o meio Tyrode, que contem piruvato (0,0385mg/ml), apresentou os valores de velocidades espermáticas aumentados, quando comparado ao BSAG que também contem piruvato na mesma concentração (0,0385mg/ml) e o SMK que não contem piruvato. No entanto a concentração utilizada nesses diluidores foi de 0,437mM, por tanto esta concentração possivelmente não é suficiente para que o piruvato excersa os efeitos antioxidantes.

Por outro lado, neste experimento foi encontrado que o diluidor SMK e o BSAG têm um comportamento similar quando observados os parâmetros de velocidade espermática (VSL, VCL e VAP), sugerindo que a adição do piruvato no BSAG não incrementou esses parâmetros da cinética espermática, possivelmente pela baixa concentração utilizada diluidores (0,0437 mM). Outros autores mostraram o efeito positivo do piruvato na motilidade espermática de garanhões férteis e subférteis submetidos a congelamento na dose de 2mM (GONÇALVES da SILVA et al., 2008).

7.1.3 Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) e linearidade (LIN)

A ALH é expressa em μm e corresponde à largura média da oscilação da cabeça durante seu deslocamento, que é utilizada como uma aproximação do batimento flagelar. Um valor alto de ALH acompanhado de uma diminuição da linearidade é reportado como prejudicial para a célula espermática, pois pode interferir na progressão da célula (ARRUDA, 2000). Os resultados obtidos para este parâmetro espermático, no diluidor SMT foram mais altos do que os encontrados no SMK e BSAG nas análises feitas no tempo 0 horas, 4 horas e 8 horas, igualando-se todos os tratamentos no tempo 12 horas ($P=0,2124$).

A LIN é expressa em porcentagem, é a medida do afastamento da célula espermática considerando-se a trajetória em uma linha reta, ou seja, é a razão entre $VSL/VCL \times 100 (\%)$, embora no presente experimento só foi encontrada diferença no T0 horas, para esta

característica o BSAG apresentou os valores mais altos, mas foi similar estatisticamente ao SMK e diferindo do SMT quem mostrou valores inferiores.

Os parâmetros da cinética espermática (VAP, VCL, VSL) encontrados no experimento para o BSAG foram comparáveis a os observados no SMK, além de ser superior a os outros diluidores na linearidade (LIN). Amostras com valores altos de linearidade LIN e o BCF apresentam melhor migração e penetração do muco cervical (ARRUDA et al., 2007).

O aumento do ALH associado ao diminuição do VSL e STR, essas mudanças estão relacionados com o processo de capacitação espermática, mas também com alterações da membrana, intracelulares, metabólicas ou abnormalidades mitocondriais (VIDAMENT et al., 2012).

7.1.4 A retilinearidade (STR) e Frequência de batimentos (BCF).

Em relação aos estes parâmetros de motilidade espermática avaliados pelo CASA, houve efeito significativo do diluidor no tempo 0 horas. O diluidor SMK mostrou uma porcentagem maior de células ($70,2 \pm 4,5$) quando comparado ao SMT e BSA. O efeito dos diluidores sobre este parâmetro não diferiu nos tempos 4, 8 e 12 horas. Um alto valor de STR indica que a trajetória dos espermatozóides é mais uniforme e com baixa amplitude, enquanto que uma alta LIN indica uma baixa amplitude do caminho curvilíneo e direção parecida com o caminho em linha reta (LEITE, 2008).

A STR, expressa em porcentagem, é a medida do afastamento da trajetória da célula espermática considerando-se uma linha reta, é a indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória total do espermatozoide, calculada pela relação entre $VSL/VAP \times 100$ (%). Enquanto a BCF, expressa em Hertz (Hz), é determinada pela medida da frequência com que a linha da cabeça espermática atravessa a trajetória celular em qualquer direção, foi desenvolvida visando fornecer indicações da frequência do batimento flagelar baseada nos fatos de que cada ponto é resultado da mudança do batimento, e que cada momento que o caminho curvilíneo cruza o caminho médio é o resultado de um novo batimento flagelar, assumindo que o espermatozoide gira a cada início de batimento (ARRUDA, 2000).

O BCF em todos os tempos para as amostras diluídas com SMT, BSAG e SMK foi igual para os três tratamentos. Esta característica se manteve constante ao longo das 12 horas de refrigeração e armazenado a 5°C. o impacto de este parâmetro na fertilidade tem sido

difícil de predezir, devido a que poucos dados são disponíveis na literatura (HOOGEWIJS et al., 2010).

7.1.5 Espermatozoides rápidos

Este parâmetro é pouco revisado na literatura. No presente experimento não houve efeito entre tempo e tratamento no tempo 0 horas (T0). No entanto, a porcentagem de espermatozoides rápidos foi significativamente maior para o sêmen preservado com o SMK quando comparado ao BSAG nos tempos 4 horas, 8 horas e 12 horas. Foi encontrado uma diminuição da porcentagem de células RAPID de 21,9% para o diluidor BSA e de 0,9% para o diluidor SMK. Quando comparados os diluidores com base em leite desnatado (SMT e SMK) não foi notada diferença significativa das 4 horas até as 12 horas de refrigerado o sêmen. No entanto o declínio do T0 horas ao T12 horas do diluidor SMT foi de 13,3%

A porcentagem de células rápidas 12 horas após a refrigeração em caixas botu-flex apresentou uma diminuição quando utilizado o diluidor BSAG ($49,9 \pm 3,41$) quando comparado ao sêmen *in natura* ($76,4 \pm 15,5$). Pelo contrario, o SMT e SMK não foi encontrada diferença significativa.

A avaliação das células rápidas é um parâmetro importante, que ao associa-lo com retilinearidade, sendo que quando estes valores apresentam uma redução, indica que movimento para frente é menos pronunciado (VIDAMENT et al. (2012).

Também, foi relacionada com a análise da motilidade, sendo que as células rápidas (RAP, velocidade $> 30 \mu/s$) e o valor de STR foram superiores no diluidor INRA96 quem obteve a taxa de fertilidade maior (59%) em comparação ao E-Z-MIXIN (49%) (BATELLIER et al., 2001).

A perda da porcentagem de células rápidas, esta associada a diminuição na produção de ATP suficiente para suportar os requerimentos da motilidade. O piruvato e a glicose exogena incrementam os níveis de ATP necessário para a motilidade, hiperactivação e da fosforilação da tirosina quinase e manutenção da viabilidade (VASCONCELOS et al., 2010)(BRUEMMERT et al., 2002).

7.2 ANÁLISES DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

Os diluidores estabilizam as membranas espermáticas (POMMER et al., 2002), isto é essencial para a preservação do espermatozoide e dos processos fisiológicos (capacitación e reação acrossomica) que conduzem a fertilização (BRINSKO et al., 2004). A integridade de membranas é por tanto um melhor preditor de fertilidade que a motilidade espermática.

Segundo os resultados da porcentagem de células PIAIA, já no tempo 0 horas (T0) é possível observar que o sêmen sofreu lesão considerável das membranas. Os valores foram baixos para esta característica, as porcentagens foram de $69,53 \pm 13,1$; $57,7 \pm 13,1$ e $34,5 \pm 12,6$, no sêmen diluído no SMT, SMK e BSAG, respectivamente, mas não mostraram diferença significativa entre tratamentos, comprovando a susceptibilidade da célula espermática de equinos a estes danos. Seguindo das 4 horas de refrigeração (T4), os resultados não apresentaram melhora nesta característica, pelo contrário observou-se um declínio da porcentagem para todos os tratamentos.

O sêmen diluído com o BSAG teve um impacto negativo sobre este parâmetro, não foi eficiente na estabilização de membranas provocando uma perda da integridade, no tempo 0 horas só um $34,5 \pm 12,6\%$ de células com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e alto potencial de membrana (PIAIA) foram encontradas. Ainda durante o processo de refrigeração houve uma redução desta população, sendo que do tempo 0 horas até as 12 horas o declínio foi de 9,5%. Igualmente, não foi observado efeito de interação entre tempo e tratamento na porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de mitocôndria (PIAIA). No entanto houve diferença entre os diluidores utilizados. No diluidor SMT foi melhor preservada esta população de células, seguido pelo SMK. O diluidor BSAG, foi encontrado como o pior diluidor na manutenção de células íntegras com uma porcentagem de $(25,8 \pm 14,8)$.

No presente experimento 12 horas após a refrigeração não houve diferença significativa da população de células PIAIA, coincidindo com a manutenção da motilidade com valores similares aos do sêmen *in natura*, quando utilizado os diluidores SMT e SMK, porém, houve uma queda notória quando foi utilizado o BSAG com valores baixos ($25,0 \pm 19,6\%$) no tempo 12 horas (T12).

Neste experimento, o sêmen *in natura* apresentou 50% de células PIAIA. Estas amostras podem ter recebido influência negativa dos componentes do meio TALP *sperm*

utilizado para a incubação das sondas. O processo de refrigeração produz injúrias em diferentes compartimentos, principalmente nas membranas e possivelmente afeta o citoesqueleto e as mitocôndrias (PEÑA et al., 2012). O resultado de outra pesquisa mostrou que o decréscimo da integridade das membranas espermáticas para sêmen centrifugado e não centrifugado foi acentuado a partir das 48 horas (RAPHAEL et al., 2008).

Alguns autores realizam o comparativo entre o declínio da motilidade com o declínio na porcentagem de células PIAIA. Desta maneira é possível observar que a motilidade é mais sensível às mudanças na fisiologia espermática, isto durante o processo de refrigeração. O estudo determinou que os valores de motilidade total e integridade de membranas no tempo imediatamente após a colheita foram similares, mas após a refrigeração e armazenamento durante períodos de 24 ou 48 horas a integridade das membranas era mantida até às 48 horas, pelo contrario a motilidade declinava às 24 horas (FOSTER et al., 2011).

Os resultados da presente pesquisa da porcentagem de células MPI no tempo 0 horas foram $75,3 \pm 11,0$, $64,3 \pm 11,8$ e $47,3 \pm 16,7$ para os diluidores SMT, SMK e BSAG, respectivamente. A redução de este parâmetro no BSAG foi observada imediatamente após diluição e continuo diminuindo ao longo das 12 horas derefrigeração, a queda foi de 10,1% do T0 ao T12 horas. A porcentagem média de células com membrana plasmática intacta (MPI) foi de $65,6 \pm 19,3\%$, $40,8 \pm 20,0$ e $60,8 \pm 17,8$ para os diluidores SMT, BSAG e SMK respectivamente. Demonstrando que o diluidor que contem BSAG desestabiliza as membranas possivelmente pelo conteúdo de BSA 1% ou pela ausência dos componentes protetores do leite como as β -lactoglobulina que neutralizam as proteínas do plasma seminal que provocam efluxo de lipídios reduzindo o efluxo de lipídeos da membrana plasmática do espermatozoide (MANJUNATH, 2012). A alteração da fluidez da membrana plasmática e a integridade funcional (MPI%) pela peroxidação lipídica é a maior causa de perda da motilidade e capacidade de fertilização, embora o processo de refrigeração reduza a taxa de peroxidação lipídica conservando melhor as membranas (BRUEMMERT et al., 2002). Diferentes dados foram obtidos por uma pesquisa similar feita por Azis et al. (2012), quem obtiveram resultados com diferença significativa entre os três diluidores utilizados no tempo 0 horas para a variável de integridade de membrana plasmática (vivos e mortos) usando o SYBR-14, integridade de acrossoma (LYSO-G®), e atividade mitocondrial (Rhodamine 123). Igualmente, a porcentagem de células com membrana plasmática lesada foi menor à obtida na nossa pesquisa.

Nessa mesma pesquisa (AZIS et al., 2012), a porcentagem de integridade de membrana plasmática (MPI) encontrada no tempo 0 horas para os diluidores a base de leite desnatado e

glicose (SMG), com leite desnatado suplementado com meio de Tyrode (SMG-T) e o diluidor de leite desnatado adicionado de Tyrode e submetido a centrifugação (SMG-T-C), foi de $72 \pm 15,1$; $84,7 \pm 4,7$ e $81,6 \pm 6,1\%$, respectivamente. O suplemento com o meio Tyroide que é rico em potássio e sódio, foi superior para esse parâmetro espermático, constatando que tanto o potássio como o sódio são importantes na regulação da função espermática. Portanto é sugerido que os componentes do diluidor influenciam na manutenção da integridade da membrana plasmática espermática após diluição.

Igualmente, não foi achado efeito de interação entre tempo e diluidor na refrigeração do sêmen, nem efeito isolado do tratamento, sobre a porcentagem de células com membrana acrossomal intacta (MAI), a qual se manteve alta mesmo depois de 12 horas de refrigeração ($94,8 \pm 6,8$ e $96,5 \pm 3,7\%$).

Contudo, a integridade do acrossoma espermático reportada em outro estudo foi diminuída em temperaturas de estoque de $-0,5^\circ\text{C}$, sugerindo assim a sensibilidade do acrossoma equino ao estresse térmico. Os resultados relatados pelo autor para a característica de MAI em temperatura de estoque de 5 a 7°C foi de 77% após 22 horas do processo de refrigeração (VIDAMENT et al., 2012).

A integridade do acrossoma diminuiu durante os 90 minutos de incubação a 34°C e após 18 horas de armazenamento a 15°C , sendo que a presença de uma fonte de proteína incrementa a integridade do acrossoma, então os autores constataram que o BSA na concentração de 1% não incrementa a incidência de danos ao acrossoma (GIBB et al., 2011).

Concordando com nossos resultados, no estudo de Aziz et al. (2012), a integridade acrossomal foi superior no diluidor a base de leite desnatado e suplementado com o meio de Tyroide (SMG-T) em comparação ao diluidor de leite desnatado-glicose (SMG) utilizados nessa pesquisa. Porém, ao observar os valores de integridade no acrossoma desses dos diluidores ($82,0 \pm 5,1$ e $64,2 \pm 12,4\%$, respectivamente), eles diferem dos dados para os diluidores usados na presente pesquisa, cujos valores não foram superiores a 10% de membrana acrossomal lesada (MAL), sem diferença significativa entre tratamentos, nem 12 horas após a refrigeração. Segundo nossos dados, pode-se sugerir que a mudança da temperatura durante o resfriamento da célula espermática não altera as características físicas da membrana acrossomal.

A reação acrossômica é um evento de exocitótico iniciado imediatamente após a ligação principal de um espermatozoide ao ovócito. A membrana plasmática do espermatozoide se funde com a membrana acrossomal externa em múltiplos locais e os conteúdos são liberados do acrossoma. As enzimas hidrolíticas liberadas são necessárias para dissolver a matriz da

zona pelúcida em torno do espermatozoide penetrante e permitir que ele entre no espaço perivitelino. No entanto, se a reação é iniciada no acrossoma muito cedo, as enzimas serão perdidas e os espermatozoides não serão mais capazes de penetração através da zona e, por conseguinte, a fertilização.

Parece que certos componentes do meio, tais como a albumina, Ca_2 , e HCO_3^- , desempenham um importante papel na promoção da capacitação em todas as espécies (VISCONTI; MOORE, 1998). As propriedades e componentes dos diferentes meios, tais como a inclusão de bicarbonato, podem, potencialmente, induzir alterações da membrana (SCHEMBRI et al., 2008). O bicarbonato presente no diluidor pode ser desencadeador da capacitação. As concentrações deste composto foram de 0,735 mg/mL (8,75mM) para o BSAG e o SMT, diferente do SMK 1,5 mg/mL (17,9mM). Essas concentrações são importantes em razão do bicarbonato manter o ambiente controlado para que a capacitação fora da tuba uterina não aconteça. Este composto é conhecido também por ser um importante efector da motilidade espermática (DICKSON; VARNER, 2011).

A concentração de bicarbonato no plasma seminal (<1mM), é baixa na cauda do epidídimo local onde ficam armazenados os espermatozoides, porém presente na tuba uterina em altas concentrações (>15mM), segundo Harrison et al. (1996) estes achados são na espécie suína. Pelo contrário Dickson e Varner (2011) reportaram que o bicarbonato está presente em concentrações relativamente elevadas no plasma seminal, e podem ser mais elevados no plasma seminal de garanhões do que alguns outros mamíferos estudados. Porém, o fluido da cauda do epidídimo de touros, carneiros, javalis e garanhões não contém quantidades mensuráveis de bicarbonato (HCO_3^-). Este composto é conhecido por ser um importante efector da motilidade espermática (DICKSON; VARNER, 2011). Os níveis intracelulares de bicarbonato também podem aumentar pela entrada de bicarbonato na célula via canais iônicos na membrana plasmática. Uma alternativa de explicação para a entrada do bicarbonato é que os níveis de $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ estão em equilíbrio em compartimentos intra e extracelulares pela difusão de gás através da membrana plasmática, sendo a anidrase carbônica, que está presente na cabeça do espermatozóide, envolvida na manutenção da alta concentração intracelular de bicarbonato pela conversão do CO_2 difundido (FLESCHE & GADELLA, 2000).

Rathi et al., 2001 investigou as vias de capacitação e reação acrossômica, ele determinou que o bicarbonato a concentração de 15mM durante 5 horas de incubação em um meio Tyroide aumentou significativamente a proporção de espermatozoides de garanhão que acrossoma reagido.

O bicarbonato é um sinalizador intracelular para a capacitação. Entre os processos que são regulados pelo bicarbonato está como principal a ativação da adenilato ciclase, com indução subsequente da proteína quinase A (PKA), a qual, via fosforilação da proteína tirosina, ativa direta ou indiretamente o deslocamento de fosfolípidios levando a um aumento da fluidez da membrana plasmática (GADELLA et al., 2001). Também, o bicarbonato incrementa o pH intracelular durante a capacitação e a diminuição do teor de colesterol só ocorre na presença de bicarbonato. Em adição, as concentrações de bicarbonato são baixas no epidídimo e altas no plasma seminal e tubas uterinas (VISCONTI; MOORE, 1998).

Alteração de fosfolípidos e de acumulação de ácidos graxos livres pode resultar num aumento da permeabilidade da membrana plasmática e mitocondrial, e do potencial de morte das células (AMMAN e PICKETT, 1987). Estes efeitos parecem ser importantes para a ligação do espermatozoide e à reação acrossômica. A fragilidade das membranas plasmáticas dos espermatozoides capacitados é claramente demonstrada pelo fato de que eles serão submetidos à reação acrossômica espontânea como resultado do simples resfriamento de 38°C para 30°C (VIDAMENT et al., 2012).

O deslocamento dos fosfolípidos é dose dependente dos níveis de bicarbonato, sendo que eles podem se movimentar na ausência do bicarbonato quando há inibidores da fosfodiesterase os quais inibem a quebra do AMPc, ativadores da PKA, inibidores da fosfatase 1 e 2a e pela adição de análogos do AMPc (FLESCH; GADELLA, 2000)

Em relação à avaliação da função mitocondrial durante o processo de refrigeração, os dados encontrados no presente experimento constataram que a refrigeração de semen equino a 5°C leva a diminuição do potencial de mitocôndria. A população de células com alto potencial de mitocôndria (APM) do sêmen *in natura* apresentou uma diminuição de 11,8%, 12,1% e 24,9% nos diluidores SMT, SMK e BSAG, respectivamente. Estatisticamente não houve diferença do diluidor SMT e SMK em comparação ao sêmen *in natura* no tempo 12 horas da refrigeração. Porém, após diluição, observou-se uma queda gradual desta característica para os três diluidores.

A porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria apresentou um declínio marcado entre as 0 e 4 horas da refrigeração (7%, 9,7% e 13,9%) para os três diluidores avaliados. Após as 4 horas até 12 horas de refrigeração, foi preservado o potencial de mitocôndria no semen diluído com SMK e BSAG (1,3%, e 2,1%) respectivamente. Já o SMT não foi tão eficiente para manter a integridade mitocondrial nesse intervalo de tempo, apresentando uma queda de (7,5%). Esses danos podem ser decorrentes da maior susceptibilidade desta estrutura à peroxidação oxidativa durante as primeiras horas da

refrigeração. As mitocôndrias quando lesadas são incapazes de realizar o metabolismo oxidativo de forma correta, levando a geração de EROs (ANDRADE, 2010; BALL, 2008).

O efeito antioxidante do piruvato não mostrou o efeito positivo na integridade mitocondrial, demonstrado nos diluidores SMT e BSA que contem a mesma concentração de piruvato e apresentaram na meia uma porcentagem de $(64,2 \pm 17,3$ e $48,2 \pm 16,8)$, possivelmente outros componentes interferiram em este resultado. Segundo o Goncalves da Silva et al., (2008) o piruvato, por ser um antioxidante e um substrato energético, promove a funcionalidade da mitocôndria.

O papel da mitocôndria na fisiologia espermática é de proporcionar energia em forma de ATP para manter a motilidade, entretanto é a fonte principal de EROs e parece ser a estrutura celular mais susceptível a danos durante os processos de preservação. Recentes estudos sinalizaram que as mudanças da osmolalidade são mais prejudiciais para a mitocôndria que para a membrana plasmática (PEÑA et al., 2012).

A mitocôndria é necessária também para a manutenção do gradiente Na^+/K^+ , uma das atividades mais importantes ao longo da membrana. A bomba de Na^+/K^+ também está envolvida indiretamente no transporte de outras substâncias e assim regula os gradientes químico e elétrico da membrana plasmática, que influenciam na sobrevivência espermática.

O diluidor SMT apresentou melhor capacidade de preservação da função mitocondrial, em comparação aos outros diluidores. O principal diferencial entre esses diluidores é a relação Na^+/K^+ , o que sugere que o SMT melhora os parâmetros de integridade de membranas que pode estar relacionado à proteção contra o estresse osmótico.

Padilla e Foote (1991) descreveram que o plasma seminal tem uma relação entre o gradiente de Na^+/K^+ de 4,6:1, para o diluidor a base de leite desnatado e glicose de 1:1, e para o meio de leite desnatado suplementado com o meio Tyrode foi de 4,3:1.

7.3 ANÁLISES DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia espermática é um dos componentes importantes para garantir a fertilidade do sêmen equino. A porcentagem normal de espermatozoides varia entre garanhões e mesmo dentro de garanhões ao longo do tempo. É relatado na literatura que a incidência de defeitos de acrossoma é baixa para equinos; os defeitos de cabeça pelo contrário apresentam

incidência relativamente alta. Porém, alguns destes defeitos morfológicos sejam desenvolvidos por insultos unicamente durante a espermatogênese (BRITO, 2007).

O aumento de defeitos espermáticos após a refrigeração esperados são os defeitos de cauda, defeitos de peça intermediária e alguns defeitos de cabeça, todos relacionados com danos osmóticos ou oxidativos das membranas. Principalmente, a alta produção de EROs leva ao aumento das alterações morfológicas, por tanto a longevidade seminal esta relacionada com o nível de alterações morfológicas (ALMEIDA, 2004).

Houve um aumento do porcentual de defeitos totais (DT), caracterizados pelo aumento de defeitos maiores (DMA), após as 12 horas de refrigeração. Os defeitos menores (DME) diminuíram gradualmente ao longo do tempo de refrigeração sem diferença entre diluidores. Durante o processo de refrigeração é mínima a porcentagem de danos no acrossoma.

Pelo contrario Raphael et al., (2008), reportaram que o aumento do tempo de refrigeração não interfere nas alterações morfológicas. Em relação à diminuição de defeitos menores (DME), segundo a literatura, pode ser normal a redução deste tipo de alterações na morfologia espermática, uma causa pode ser a perda da gota protoplasmática distal, outra a que as alterações de cauda dobrada e cauda enrolada podem passar a ser fortemente dobrada e fortemente enrolada, passando a contar como defeitos maiores, gerando uma maior proporção de DMA (CELEGHINI, 2005), como observado nos resultados do presente experimento e outra hipótese pode ser que a morte celular é vista como células espermáticas com caudas retas sem dobramento do axonema (LEITE, 2008).

A diferença do efeito dos diluidores foi observada também nas características da morfologia espermática, sendo que o diluidor BSAG apresentou a maior proporção de defeitos maiores (DMA) e, por conseguinte um aumento nos defeitos totais (DT). Em particular, os defeitos de cauda (DCAU) estiveram aumentados, indicando que o diluidor BSAG não protege eficientemente a membrana e pode estar afetado o axonema, isto pode levar a uma maior proporção de defeitos de cauda (LEITE, 2008). Esses efeitos poderiam ser explicados com base na diferente composição do diluidor, fazendo que o diluidor BSAG não preserve da melhor maneira as membranas espermáticas, e pode ter influência negativa também na estrutura interna do citoesqueleto. No entanto, no presente experimento não foram utilizados métodos laboratoriais para identificar esse tipo de danos de ultraestrutura (GUTIÉRREZ-PÉREZ et al., 2011).

7.4 ANÁLISE DA CROMATINA ESPERMÁTICA

Para a avaliação do grau de descondensação da cromatina espermática foi escolhida a técnica de azul de toluidina devido a sua simplicidade, baixos custos, sendo que não requer equipamentos custosos, precisando só de microscópio com fonte de luz e também devido à alta correlação que tem sido reportada quando comparado a outras técnicas de análise da cromatina, como SCSA, acridina laranja, aniline blue e TUNEL (ERENPREISS et al., 2001). O azul de toluidina tem bastante afinidade pelos grupos fosfato das fitas descondensadas do DNA, é um método simples quando comparado a outras técnicas que precisam da citometria de fluxo, no entanto, devido à metacromasia, os espermatozoides são corados em diversos tons de azul, dificultando a leitura, além que a interpretação é subjetiva (NAVES et al., 2004).

O método Azul de Toluidina é mais estável e possui maior sensibilidade do que laranja de acridina (KAMIMURA; JACOMINI; BELETTI, 2010). A superioridade do Azul de toluidina em relação à laranja de acridina sugere que esta coloração é mais sensível para identificar as alterações no complexo DNA-Proteína em espermatozoides de equinos, pela determinação da quantidade de grupos fosfato livres (NAVES et al., 2004).

A cabeça dos espermatozoides dos mamíferos é quase que totalmente constituída de cromatina, portanto espera-se que alterações em tais estruturas sejam acompanhadas por anomalias morfológicas (BELETTI et al., 2005).

Neste experimento o processo de refrigeração de sêmen equino a 5°C ao longo das 12 horas não provocou uma porcentagem significativa de células altamente descondensadas (ATIII), que seja indicativo de susceptibilidade da cromatina espermática, em nenhum dos diluidores estudados.

No entanto, BSAG causou aumento de descondensação moderada (ATII) da cromatina espermática após as 12 horas de armazenamento a 5°C. Sendo que, às 12 horas da refrigeração pela técnica de azul de toluidina foram achados um $5,0 \pm 4,7\%$ de células moderadamente descondensadas. Existe um relato de garanhões férteis apresentando 6,18% de alterações na cromatina espermática detectadas pela técnica de azul de toluidina e nos mesmos animais usando a técnica fluorescente de acridina laranja foi achado um 3,27% (NAVES et al., 2004)

Coincidindo com Blottner et al. (2001), eles observaram que as porcentagens de espermatozoides com cromatina desnaturada foram mínimas e mostraram diferenças mínimas entre sêmen fresco e congelado, entre garanhões, ou entre estações. A porcentagem de

espermatozoides com DNA fragmentado em um ejaculado não está correlacionada com a qualidade do sêmen, segundo os achados, um espermatozoide com DNA fragmentado pode fertilizar um ovócito.

O DNA de espermatozoides refrigerados poderiam não mostrar danos após 46 horas de armazenagem a 5°C, quando processado corretamente, o que inclui adequada colheita, diluição e menor exposição a substâncias tóxicas (LOVE, 2005). No entanto o dano ao DNA poderia ocorrer entre 1 a 6 horas de incubação a 37°C (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007).

A variação do grau de descondensação da cromatina entre indivíduos foi observada em resposta à refrigeração e não no sêmen fresco (CARRETERO et al., 2011), o que reforça a teoria que nem todos os machos respondem de maneira similar aos protocolos de preservação de sêmen. Em outro estudo foi notado que a dinâmica da fragmentação do DNA em ganhões varia de acordo com o indivíduo (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007).

Todavia, não foram achadas diferenças entre os valores obtidos do índice de dano espermático para o sêmen refrigerado e congelado, indicando que qualquer alteração observada, em termos de danos no DNA, não é produto da metodologia de armazenamento (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007). Por outro lado, autores sugerem que os danos do DNA após refrigeração ou de congelação é provável que seja uma consequência indireta dos fatores de estresse associados com alterações na osmolalidade, temperatura e instabilidade da membrana plasmática (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2007).

Um estudo avaliando a influência de dois diluidores, o Kenney (CST) e o SMT, com diferentes níveis de plasma seminal sobre a manutenção da motilidade espermática e a integridade do DNA no sêmen refrigerado a 5°C, mostrou que: a redução na integridade do DNA pode ocorrer apesar da manutenção da motilidade dos espermatozoides, o que pode explicar porque alguns ganhões experimentam redução da fertilidade com sêmen refrigerado armazenado mesmo que a motilidade espermática seja mantida (LOVE et al., 2005). A utilização do diluidor Kenney (CST) combinado com plasma seminal (CST-20%, CST-10% e CST-20%-centrifugado plasma seminal) mostrou melhor preservação da motilidade, mas a integridade do DNA foi reduzida, em comparação ao KMT (LOVE et al., 2005).

Finalmente, avaliações da condensação da cromatina espermática como um complemento de espermograma de rotina, podem ser úteis como ferramentas de diagnóstico para a previsão do potencial de fertilização, uma vez que a instabilidade do núcleo está associada com a infertilidade, insuficiência reprodutiva pós-fertilização ou ambas (DIAS et al., 2006).

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- A refrigeração do sêmen equino a 5°C altera a cinética espermática de forma oscilante entre os diluidores no decorrer do tempo, sendo que após 12 horas o diluidor BSAG é menos eficiente para a preservação de motilidade total, motilidade progressiva e células rápidas em relação à SMT e SMK.
- A preservação concomitante da integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial, avaliada por asociação de sondas fluorescentes, é menos eficiente com o diluidor BSAG do que SMT e SMK após a refrigeração a 5°C por 12 horas, sendo que com o decorrer do tempo de refrigeração há aumento nas lesões nestas estruturas.
- A membrana acrossomal não é afetada pela refrigeração do sêmen a 5°C por até 12 horas, independente do diluidor utilizado (SMT, BSAG e SMK).
- Os defeitos maiores e totais aumentam após a refrigeração do sêmen com diluidor BSAG em relação aos SMT e SMK, mostrando uma baixa eficiência na preservação da morfologia espermática.
- A diluição do sêmen leva a aumento dos defeitos menores, com posterior queda dentro das primeiras 4 horas da refrigeração, apresentando o mesmo comportamento para os três diluidores, embora o BSAG apresenta o menor percentual em relação aos SMT.
- Os espermatozoides diluídos no BSAG aumentam a porcentagem de defeitos de cauda imediatamente após a diluição quando comparado aos diluidores SMT e SMK, não sofrendo alteração no decorrer de 12 horas de refrigeração a 5°C.
- Os diluidores SMT e SMK tem a mesma eficiência na preservação da cromatina espermática, quando refrigerados a 5°C até 12 horas de armazenamento, no entanto o BSAG atua de forma distinta provocando uma susceptibilidade a danos na cromatina após 12 horas de refrigeração.

- O uso dos diluidores SMT e SMK garante melhor preservação da cinética, integridade de membranas e morfologia espermática a 5° C por 12 horas semelhante ao sêmen *in natura*.
- Diluidores para refrigeração do sêmen equino a 5° C por 12 horas sem leite desnatado e com adição de BSA 1%, como o diluidor BSAG, provocam decréscimo sobre motilidade total, motilidade progressiva, células rápidas, integridade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e aumento das alterações morfológicas e descondensação moderada da cromatina em relação ao sêmen *in natura*.

É ratificado que o processo de refrigeração leva a diminuição da qualidade seminal ao longo do tempo, no entanto os efeitos não são significativos até 12 horas da refrigeração a 5° C quando utilizados diluidores a base de leite desnatado. Portanto, pode ser recomendado o uso do diluidor SMT e SMK, considerando que o diluidor mais apropriado para uso rotineiro seria o SMK devido a facilidade de preparo e baixo custo, sendo que o SMT apresenta uma pequena melhoria na preservação de membranas e aumento da velocidade espermática.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, p. 497–506, 2001.
- ALGHAMDI, A. S.; LOVAAS, B. J.; BIRD, S. L.; BIRD, S. L.; LAMB, G. C.; RENDAHL, A. K.; TAUBE, P. C.; FOSTER, D.N. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm-neutrophil binding. **Animal Reproduction Science**, v. 114, n. 4, p. 331–344, 2009.
- ALMEIDA, A. C. de; MOTA E SILVA, G.L.; FONSECA, M. Y.; BUELTA, T. T. M.; FERNANDES, E. C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru consumido na cidade de alfenas, MG. **Revista Universitaria de Alfenas**, v. 5, p. 165–168, 1999.
- ALTHOUSE, G. C. Sanitary procedures for the production of extended semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 374–378, 2008.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145–173, 1987.
- ANDRADE, A. F. C. de; ZAFFALON, F. G.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; ALONSO, M. A.; ARRUDA, R. P. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: what is the effect on sperm cell viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 682–686, 2011.
- ANDRADE, A. F. C. de. **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de eqüinos**, 2009. 132 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ANDRADE, A. F. C. de; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; TARRAGÓ, O. F. B.; MARTINS, S. M. M. K.; RAPHAEL, C. F.; MORETTI, A. S. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 194, p. 190–194, 2007.
- ARAVINDAN, G. R.; BJORDAHL, J.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. **Experimental Cell Research**, v. 236, p. 231–237, 1997.
- 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, n. 19, p. 145–151, 2011.
- ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. DE; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C.F.; ZAFFALON, F. G.; MARTINS, S.M.M.K.; NASCIMENTO, J.; ALONSO, M.A.; MEJIA, A.G. Manipulação e uso do sêmen transportado refrigerado de garanhões. In: SIMPÓSIO DE

EQUIDEOCULTURA. SIMEQ, 2., 2009, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 111-131.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. de; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 17, p. 8–16, 2007.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2000.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65–75, 2005.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 268–75, 2008.

AZIZ, D. M.; ENBERGS, H. Effect of seminal plasma removal on cell membrane, acrossomal integrity and mitochondrial activity of cooled stallion semen. **Journal of Advanced Veterinary**, v. 2, p. 148–152, 2012.

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.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061–1069, 2001.

BARRATT, C. L. R.; AITKEN, R. J.; BJORNDahl, L.; CARRELL, D.T.; BOER, P.de; KVIST, U.; LEWIS, S.E. M.; PERREAULT, S.D.; PERRY, M.J.; RAMOS, L.; ROBAIRE, B.; WARD, S.; ZINI, A. Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications — a position report. **Human Reproduction**, v. 25, n. 4, p. 824–838, 2010.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181–190, 2001.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANTZ, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391–410, 1997.

BAVISTER, B. D.; EDWARDS, R. G.; STEPTOE, P. C. Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs in vitro. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 20, p. 159–160, 1969.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 22, p. 85–90, 2005.

- BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1-2, p. 75–88, 2001.
- BRADECAMP, E. A. How to process high- and low-quality semen for cooling and shipment. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 57. San Antonio, Texas. **Proceedings...** 2011. v. 57, p. 19–23.
- BRANDÃO, A. C.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MARTINS, J. F. P.; ASSUMPCAO, M. E.O.D'; VISINTIN, J. A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozoides em garanhões. **Brazilian Journal de Veterinária**, v. 43, p. 68–73, 2006.
- BRINSKO, S.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. Transporte de sêmen equino. Department of Large Animal Medicine and Surgery, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, USA, 17 april 2000.
- BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249–264, 2007.
- BRUEMMERT, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 12–18, 2002.
- BURNAUGH, L.; BALL, B. A.; SABEUR, K.; THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 249–260, 2010.
- CARRETERO, M. I.; GIULIANO, S. M.; CASARETTO, C. I.; GAMBAROTTA, M. C.; NEILD, D. M. Evaluation of the effect of cooling and of the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue. **First International Journal of Andrology**, v. 44, p. 239–247, 2011.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. de; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrossomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479–488, 2007.
- CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. de; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R.P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1285–1292, 2010.
- CRESPILHO, A. M.; SPIZZIRI, B. E.; MEYERS, M.; GRAHAM, J. K. The effect of cholesterol addition, buffer, and ph on equine sperm stored at 5°C. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 1–4, 2012. In press

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Operational Standards for CASA Instruments. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 5, p. 385–394, 1993.

DIAS, G. M.; RETAMAL, C. A.; TOBELLA, L.; ARNHOLDT, A. C. V.; LÓPEZ, M. L. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 354–65, 2006.

ERENPREISS, J.; BARS, J.; LIPATNIKOVA, V.; ERENPREISA, J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 1, p. 45–53, 2001.

ERENPREISS, J.; SPANO, M.; ERENPREISA, J.; BUNGUM, M.; GIWERCMAN, A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 1, p. 11–29, 2006.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin concentrations suggests that it may be heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1–3, 1980.

FERNÁNDEZ, J. L.; MURIEL, L.; RIVERO, M. T.; GOYANES, V.; VASQUEZ, R.; ALVAREZ, J.G. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 1, p. 59–66, 2003.

FERRER, M. S.; LYLE, S. K.; EILTS, B. E.; ELJARRAH, A. H.; PACCAMONTI, D. L. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1814–23, 2012.

FLAHERTY, C. O.; LAMIRANDE, E. de; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: Triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 528–540, 2006.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197–235, 2000.

FORTUNATO, A.; LEO, R.; LIGUORI, F. Effects of cryostorage on human sperm chromatin integrity. **Zygote**, v.8, p. 1–7, 2012.

FOSTER, M. L.; VARNER, D. D.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T. L. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1499–1505, 2011.

FRANCO, G. R. R.; FRANCO, A. C. C. Use of dyes like diff-quick to assess the integrity of sperm chromatin and its relation to human sperm processing, fertilization, cleavage and pregnancy. **Journal Brasileiro de Reprodução Assistida**, v. 15, p. 31–34, 2011.

FREITAS-DELL'AQUA, C. D. P.; MONTEIRO, G. A.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F. O. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 1–5, 2012. In press

- GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 249–65, 2001.
- GARCÍA, B. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; ORTEGA-FERRUSOLA, M. SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRÍGUEZ, A.M.; MARTINEZ, R. H.; TAPIA, J. A. MORCUENDE, D.; PEÑA, F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 141–8, 2011.
- GIBB, Z.; MORRIS, L. H. A.; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Use of a defined diluent increases the sex-sorting efficiency of stallion sperm. **Theriogenology**, v. 75, n. 4, p. 610–619, 2011.
- GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K.; SQUIRES, E.L.; JAMES, K.; GRAHAM, J. K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 201–206, 2009.
- GONÇALVES da SILVA, K. M.; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelamento de sêmen de garanhões férteis e subférteis sêmen. **Ciência Animal Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 2271–2277, 2008.
- GORCZYCA, W.; TRAGANOS, F.; JESIONOWSA, H.; DARZYNKIEWJIZ, Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells analogy to apoptosis of somatic cells. **Experimental Cell Research**, v. 207, p. 202–205, 1993.
- GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 169–180, 2012.
- GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M. L.; MOTA, D.; TRUJILLO, M. E. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. **Cryobiology**, v. 62, n. 1, p. 32–9, 2011.
- HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P.; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 849–856, 2010.
- HERENG, T. H.; ELGSTØEN, K. B. P.; CEDERKVIST, F. H.; EIDE, L.; ROSENDAL, K. R.; JAHNSEN, T.; SKALHEGG, B. S.; ROSENDAL, K. R. Exogenous pyruvate accelerates glycolysis and promotes capacitation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 26, n. 12, p. 3249–3263, 2010.
- HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 1–21, 2011.

JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, W. D.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241–1252, 1992.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L. MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares. Technique and preliminary findings. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRATTITIONERS, 1975. **Proceedings ...** v. 21, p. 327-336. 1975.

KAMIMURA, C. D. F.; JACOMINI, J. O.; BELETTI, M. E. Alterações de cromatina em espermatozoides de ovinos e caprinos avaliadas por azul de toluidina e alaranjado de acridina. **Ciencia Agrotecnica**, v. 34, p. 212–219, 2010.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1354–1365, 2005.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 249–256, 2008.

KARESKOSKI, M.; SANKARI, S.; JOHANNISSON, A.; KINDAHL, H.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. The association of the presence of seminal plasma and its components with sperm longevity in fractionated stallion ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 1073–1081, 2011.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217–1227, 1997.

KAZEROONI, T.; ASADI, N.; JADID, L.; KAZEROONI, M. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 26, p. 591–596, 2009.

LAMIRANDE, E. de; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

LEITE, T.G. de. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de Integridade das membranas espermáticas de touros gir Leiteiro**, 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

LEFRAPPER, L.; WALSTON, L.; WHISNANT, C. S. Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 4, p. 200–204, 2010.

LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 107–113, 2002.

- LOOMIS, P. R. Biosecurity and quality assurance in equine semen production centers. In: PROCEEDINGS ASSOCIATION FOR APPLIED ANIMAL ANDROLOGY CONFERENCE, 2012, Vancouver. **Anais...** 2012. p. 115-123
- LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; VOGUE, J.; BLISS, S.; SUDDERTH, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. **Theriogenology**, v. 77, n. 9, p. 1911–1917, 2012.
- LOVE, C. C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 39–45, 2005.
- LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; THOMPSON, J. A.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1584–1591, 2005.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 1135–1142, 2002.
- LOVE, C. C.; KENNEY, R. M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, v. 50, p. 955–972, 1998.
- LOVE, C. C. Evaluation of Stallion Sperm Morphologic Features. In: ADVANCE CURRENT TOPICS IN STALLION VETERINARY PRACTICE, 2000, Krakow, Poland. **Proceedings...** 2000.
- LUSIGNAN, M. F.; BERGERON, A.; LAFLEUR, M.; MANJUNATH, P. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457–64, 2011.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CRESPO, F.; ARROYO, F.; FERNÁNDEZ, L.; ARANA, P.; JOHNSTON, S. D.; GONSÁLVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. **Theriogenology**, v. 68, p. 1240–1250, 2007.
- MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809–815, 2012.
- MELLO, M. L. S. Induced metachromasia in bull spermatozoa. **Histochemistry**, v. 74, p. 387–392, 1982.
- MORALES, R.; LLEDÓ, B.; ORTIZ, J. A.; RODRÍGUEZ-ARNEDO, D.; FABREGAT, A.; BERNABEU, R. Sperm DNA fragmentation and implications for fertility. **Revista Iberoamericana de Fertilidade**, v. 24, n. 5, p. 305–313, 2007.
- MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 999–1012, 1992.

- MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J. E.; DRAPER, D.; GROUT, B. W. W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, p. 804–812, 2007.
- MOTA, P. C.; RAMALHO-SANTOS, J. Comparison between different markers for sperm quality in the cat: Diff-Quik as a simple optical technique to assess changes in the DNA of feline epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1360–75, 2006.
- NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351–358, 2008.
- NAVES, C. S.; BELETTI, M. E.; DUARTE, M. B.; VIEIRA, R. C. Avaliação da cromatina espermática em eqüinos com azul de toluidina e acridine orange. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 3, p. 117–124, 2004.
- NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E.; COSTA E SILVA, E. V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 1-2, p. 42–56, 2007.
- ORTEGA-FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; PEÑA VEGA, F. J.; TAPIA, J. A. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; DALIN, A. M.; MORRELL, J. M. Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 7, p. 411–416, 2011.
- PADILLA, A. W.; FOOTE, R. H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 3308–3313, 1991.
- PAGL, R.; AURICH, E. J.; MÜLLER-CHÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, p. 1115–1122, 2006.
- PARKS, E. J.; LYNCH, V. D. Lipid composition and thermotropic phase behavior stallion, and rooster sperm membranes of boar, bull. **Cryobiology**, v. 26, p. 255–266, 1992.
- PICKETT, B. W.; BURWASH, L. D.; VOSS, J. L.; BACK, D. G. Effect of seminal extenders on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 1136–1143, 1975.
- POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. **Theriogenology**, v. 58, p. 1373–1384, 2002.
- PURDY, P. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215–225, 2006.
- RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G. A.; SOARES, R. F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Effect of removing seminal plasma using a sperm

filter on the viability of refrigerated stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 1–4, 2013.

RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; ARRUDA, R. P. Effects of centrifugation on membrane integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 344–345, 2008.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RIGAU, T.; PIEDRAFITA, J.; REVERTER, A.; CANAL, M.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. The rate of L-lactate production: a feasible parameter for the fresh diluted boar semen quality analysis. **Animal Reproduction**, v. 43, p. 161–172, 1996.

RIGBY, S. L.; BRINSKO, S. P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 171–180, 2001.

RODRIGUES, A. C. N.; ROCHA, J. V.; BELETTI, M. E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1302–1307, 2009.

SAILER, B. L.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 1, p. 80–87, 1995.

SAMPER, J. C.; MORRIS, C. A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 895–903, 1998.

SCHEMBRI, M.A.; MAJOR, D. A.; SUTTIE, J. J.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Modification of standard freezing media to limit capacitation and maximise motility of frozen-thawed equine spermatozoa. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 748–751, 2003.

SIEMEN, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 769–784, 2004.

SILVA, R. T. da; MENDES JÚNIOR, J. O. B.; BELETTI, M. E. Compactação da cromatina e morfometria da cabeça de espermatozoides na produção de embriões utilizando touros zebuínos. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 30, n. 4, p. 473–478, 2009.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 370–384, 2011.

SOUSA, A. P. M.; TAVARES, R. S.; VELEZ DE LA CALLE, J. F.; FIGUEIREDO, H.;

ALMEIDA, V.; ALMEIDA-SANTOS, T. Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. **Human Reproduction**, v. 24, n. 1, p. 28–36, 2009.

SQUIRES, E. L. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 5, p. 268–273, 2009.

SQUIRES, E L; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056–1065, 2004.

TAMBURRINO, L.; MARCHIANI, S.; MONTOYA, M.; MARINO, F.E.; ILARIA, N.; CAMBI, M.; FORTI, G.; BALDI, E.; MURATORI, M. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, n. 1, p. 24–31, 2012.

TEJADA, R. I.; MITCHELL, J. C.; NORMAN, A.; MARIK, J.; FRIEDMAN S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v. 42 (1), p. 87–91, 1984.

TEJERINA, F.; BURANAAMNUAY, K.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. **Theriogenology**, v. 69, n. 9, p. 1129–1138, 2008.

TROEDSSON, M. H. T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A. S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 171–186, 2005.

UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D. M.; VISHWANATH, R. F.; SMITH, J. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, p. 275–287, 1998.

VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 448–462, 2008.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. DA. Características do Leite. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. **Boletim Técnico**, 2007.

VERRUMA, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 1, p. 131–137, 1994.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–179, 2002.

VIDAMENT, M.; MAGISTRINI, M.; LE FOLL, Y.; LEVILLAIN, N.; YVON, J. M.; DUCHAMP, G.; BLESBOIS, E. Temperatures from 4 to 15 °C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 297–307, 2012.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 907–919, 2000.

VILLAMIL, P. R.; WEI, H.; MOREIRA, G.; CACCIA, M.; FERNANDEZ TARANCO, M.; BÓ, G. A. Fertilization rates and in vitro embryo production using sexed or non-sexed semen selected with a silane-coated silica colloid or Percoll. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 165–171, 2012.

VISCONTI, E.; MOORE, D. The molecular basis of sperm capacitation review. **Journal of Advanced Veterinary**, v. 19, n. 2, p. 242–248, 1998.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 7, p. 871–891, 1995.

WEBB, G. W.; ARNS, M. J. Effect of pyruvate and lactate on motility of cold stored stallion spermatozoa challenged. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.26, n. 9, p. 406–411, 2006.

WEBB, G. W.; DEAN, M. M.; HUMES, R. A.; HEYWOOD, J. S. A comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold stored stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 4, p. 229–232, 2009.

WENDT, K. M.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; THOMPSON, T. L.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Effect of extender pH on motility characteristics of cool-stored equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, p. 321–324, 2002.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; BARTOSZ, G.; TISCHNER, M.; BUGNO-PONIEWIERSKA, M. Status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1677–1684, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – *SETUP*-HAMILTON THORNE BIOSCIENCES PARA ANÁLISE DE SÊMEN EQUINO

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas (Image capture: frames)	45
Taxa de aquisição das imagens (Image capture: frames per sec)	60 Hz
Contraste mínimo da célula (Cell detection: minimum contrast)	70 pixels
Tamanho mínimo da célula (Cell detection: minimum size)	4 pixels
Tamanho para células imóveis (Defaults: cell size)	6 pixels
Intensidade para células imóveis (Defaults: cell intensity)	106 pixels
Referência de VAP para células progressivas (Progressive cells: VAP)	50,0 $\mu\text{m/s}$
Referência de STR para células progressivas (Progressive cell: STR)	75%
Referência de VAP para células lentas (Slow cells: VAP Cut-off)	20,0 $\mu\text{m/s}$
Referência de VSL para células lentas (Slow cells: VSL Cut-off)	0 $\mu\text{m/s}$
Limite superior de tamanho da célula (Qc plots: Static size gates-Max)	1,51 pixels
Limite inferior do tamanho da célula (Qc plots: Static size gates-Min)	0,32 pixels
Limite superior de intensidade da célula (Qc plots: Static intensity gates-Max)	1,19
Limite inferior da intensidade da célula (Qc plots: Static intensity gates-Min)	0,24
Limite superior de alongamento da célula (Qc plots: Cell elongation-Max)	98%
Limite inferior de alongamento da célula (Qc plots: Cell elongation-Min)	0%
Aumento (optics: Magnification)	1,89
Temperatura (Stage: Set stage temperature) 37°C	37°C

ANEXO B – PROTOCOLO SONDAS FLUORESCENTES EQUINOS

FITC-PSA

Identificação do produto

Nome do produto: Lectina de *Pisum Sativum*

Referência do Produto: L0770- 2 mg

Marca: Sigma

- Para preparar a solução de trabalho (100µg/mL)

FICT-PSA	2 mg
----------	------

DPBS	19 mL
------	-------

Azida de sódio 10%	1 mL
--------------------	------

- Aliquotar 800 µL em microtubos de 1,5 mL.
- Estocar numa caixa criogênica.
- Armazenar a -20°C no freezer.

HOECHST 33342**Identificação do produto**

Nome do produto: Trihydrochloride, Trihydrate

Referência do Produto: H33342- 100mg

Marca: Molecular Probes

- Para preparar a solução estoque (25 mg/mL)

H342	100 mg
DMSO	4 mL

- Para preparar 1000 µL da solução de trabalho (5mg/mL)

H342	200 µL
DPBS	800 µL

- Aliquotar em microtubos de 500 µL.
- Estocar numa caixa criogênica.
- Armazenar a -20°C no freezer.

JC-1

Identificação do produto

Nome do produto: JC-1 carbocianina catiônica

Referência do Produto: T3168- 5mg

Peso molecular: 625,23 g

Marca: Molecular Probes

- Para preparar 5 mL da solução estoque 1 mg/mL (153 Mm)

JC-1 5 mg

DMSO 5 mL

- Para preparar a solução de trabalho (153 μ M)

JC-1 153 Mm 1 mL

DMSO 9 mL

- Aliquotar em microtubos de 100 μ L.
- Estocar numa caixa criogênica.
- Armazenar a -20°C no freezer.

ANEXO C – DILUIÇÕES E PREPARO DE SOLUÇÕES

SOLUÇÃO ETANOL 70%

- Para preparar 1 litro da solução

Etanol 99,5% 703,5 mL

Água destilada 296,5 mL

- Armazenado em local fresco.

SOLUÇÃO ETANOL - ÁCIDO ACÉTICO (3:1 V/V)

- Para preparar 150 mL de uma solução (3:1 V/V).

Etanol 99,5% 200 mL

Ácido Acético 100 mL

- Não usar a solução etanol - ácido. acético (3:1) por mais de três dias.

SOLUÇÃO DE HCl 4N

- Para preparar 1 litro da solução de estoque:

HCl 37 % (12N) 333,33 mL

Água destilada 666,66 mL

- Armazenar na geladeira e trocar cada 20 dias.

FOSFATO DE SÓDIO DIBÁSICO (Na₂HPO₄) 0,2 M

- Para preparar 100 mL Na₂HPO₄ 0,2 M

•

Na₂HPO₄ 2,84 g

Água destilada 100 mL

ACIDO CÍTRICO 0,1 M

- Para preparar 100 mL da solução a 0,1 M

Ácido Cítrico 2,1014 g

Água destilada 100 mL

SOLUÇÃO Mc- ILVAINE

- Para preparar o buffer Mc Ilvaine (1921) com um intervalo de pH de 2,2 a 8,0.
- Para preparar 100 mL da solução Mc Ilvaine

Na₂HPO₄ 0,2 M 38,6 mL

Ácido cítrico 0,1 M 1,45 mL

- Para corrigir o pH utilizar somente as mesmas soluções: ácido cítrico para reduzir o pH e fosfato dibásico para aumentar.

SOLUÇÃO DE TRABALHO DE AZUL DE TOLUIDINA (0,025%)

- Para preparar uma solução de 100 mL.

Azul de toluidina 0,025 g

Solução de Mc Ilvaine 100 mL

ANEXO D – pH DOS DILUIDORES, LEITURA DIÁRIA

COLHEITA	SMT	BSAG	SMK
Colheita 1	7,2	7,4	7,7
Colheita 2	7,514	7,35	7,64
Colheita 3	7,32	7,3	7,74
Colheita 4	7,53	7,3	7,56
Colheita 5	7,48	7,6	7,62
Colheita 6	7,36	7,3	7,36
Colheita 7	7,33	7,36	7,68
Colheita 8	7,41	7,35	7,56
Colheita 9	7,32	7,45	7,63
Colheita 10	7,44	7,33	7,55
Colheita 11	7,38	7,56	7,56
Colheita 12	7,27	7,5	7,51
Colheita 13	7,5	7,39	7,55
Colheita 14	7,44	7,41	7,67
Colheita 15	7,32	7,37	7,55
Colheita 16	7,47	7,5	7,65
Média±DP	7,4±0,1	7,4±0,1	7,6±0,1