CLÁUDIA FERNANDES RAPHAEL

*Efeitos da centrifugação nas características de movimento,
integridade e peroxidação lipídica das membranas do
espermatozóide eqüino refrigerado*

São Paulo

2007

CLÁUDIA FERNANDES RAPHAEL

*Efeitos da centrifugação nas características de movimento,
integridade e peroxidação lipídica das membranas do
espermatozóide eqüino refrigerado*

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

São Paulo
2007

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.1866
FMVZ

Raphael, Cláudia Fernandes

Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado / Cláudia Fernandes Raphael. – São Paulo : C. F. Raphael, 2007.

111 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Equinos. 2. Sêmen refrigerado. 3. Centrifugação. 4. Membranas.
5. Peroxidação. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide refrigerado", protocolo nº592/2004, utilizando 05 cavalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effects of centrifugation on motion characteristics, membranes integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoon", protocol number 592/2004, utilizing 05 horses, under the responsibility of Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 20 de junho de 2007

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: RAPHAEL, Cláudia Fernandes

Título: Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Prof. Dr. _____	Instituição: _____
Assinatura: _____	Julgamento: _____

Dedico aos meus pais, Luiz e Márcia, e ao meu irmão, Maurício, que sempre me apoiaram, motivaram e vibraram a cada conquista, consolaram-me frente as dificuldades, deram-me a força necessária para continuar em busca do meu sonho, fornecendo-me a segurança e a paz do mais sublime amor, sendo fundamentais em todos os momentos da minha vida...

AMO MUITO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me permitir chegar até aqui e colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Ao **Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda**, pela orientação, ensinamentos, oportunidades profissionais concebidas e, principalmente, pela amizade formada ao longo destes anos, pelas longas conversas, conselhos, paciência e até algumas discussões, inevitáveis com o convívio diário, mas que com toda certeza, valeram para meu crescimento pessoal. Ficam aqui firmados minha grande admiração, respeito e gratidão.

Ao **Prof. Dr. José Antonio Visintin**, o primeiro professor do Departamento de Reprodução Animal (VRA) com quem tive contato, pela receptividade, ajuda, ensinamentos e amizade.

Aos professores do VRA: **Dra. Annelise Traldi, Dr. Ed Madureira, Dr. Mário Binelli, Dra. Mayra Assumpção, Dr. Pietro Baruselli e Dra. Valquíria Barnabe**, pelos ensinamentos e pela tão agradável convivência.

Ao **Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa**, pelo auxílio fornecido para esta pesquisa.

À **Prof. Dra. Mariza Melo e a Silvana** do Laboratório de Química Biológica da FZEA, pelo auxílio e ensinamentos fundamentais para este experimento.

À **Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini**, exemplo de bondade e dedicação, por sua amizade, colaboração, paciência e sabedoria.

Aos pós-graduandos e amigos **André Furugen Cesar de Andrade e Juliana Nascimento**, que sempre me acompanharam, ajudaram e foram essenciais, não somente durante o experimento mas, em todo meu percurso por Pirassununga, desde o estágio até o mestrado.

A todos os outros pós-graduandos do Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia, em especial a **Karen Peres, Fabiane Zaffalon e Fabian Bao** pelo auxílio no experimento.

À pós-graduanda **Estela Kobashigawa**, por sua amizade e ajuda na dissertação.

Aos pós-graduandos **Moysés Miranda e Fabiana Bressan** pela ajuda esporádica na citometria de fluxo, assim como a secretária **Roberta**, pela paciência e colaboração.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários do VRA, em especial à **Mônica**.

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

Às secretárias **Isabel Barbosa e Harumi Shiraishi** e a supervisora técnica da biblioteca **Elza Faquim**, por toda presteza concebida.

Aos **pós-graduandos do VRA, VNP e LMMD** pela troca de informações, ajuda mútua e tantos momentos de descontração, que me favoreceram durante toda a passagem por Pirassununga, mas em especial às amigas **Francine, Paulinha, Patrícia, Sylvia e Thais**.

À **Biotech-Botucatu**, por ceder seus produtos, e a **CAPES e FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todas as pessoas que colaboraram e torceram por mim, meu eterno agradecimento!!

RESUMO

RAPHAEL, C.F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado.** [Effects of centrifugation on motion characteristics, membranes integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoon]. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O sêmen eqüino é muito utilizado na forma refrigerada, porém, para alguns ganhões, a longevidade espermática é baixa. Durante a refrigeração o espermatozóide pode ser afetado por vários fatores, que podem causar a perda da integridade da membrana plasmática, danos no acrossomo e disfunções mitocondriais, resultando em perda irreversível de motilidade e capacidade fecundante. A composição e concentração do plasma seminal podem causar efeitos deletérios ao espermatozóide, sendo a centrifugação do sêmen uma alternativa para minimizar estes efeitos. Este experimento foi realizado para verificar o efeito da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado a 5°C por até 72h. Foram realizadas cinco colheitas de sêmen de quatro ganhões. O sêmen foi avaliado quanto ao volume e concentração, e em seguida dividido em dois tratamentos, sem centrifugação (S) e centrifugado (C) (300g/10min). Ambos foram diluídos na concentração final de 30×10^6 eptz/mL em diluidor a base de leite desnatado e então refrigerados. Foram analisadas as características do movimento espermático (CASA), morfologia espermática (DIC), integridade das membranas plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA), potencial de membrana mitocondrial (JC-1) e peroxidação lipídica das membranas (C11-BODIPY^{581/591}), sendo estas três últimas análises por citometria de fluxo. As análises foram realizadas no tempo 0 e 24, 48 e 72 horas após a refrigeração. O delineamento experimental foi em blocos generalizados adicionado do fator medidas repetidas no tempo. Os dados foram analisados pelo programa SAS, submetidos à análise de variância e às interações determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisser ao nível de 5% de significância. O espermatozóide do sêmen centrifugado apresentou valores médios maiores de motilidade total e progressiva, ALH, STR e LIN ($P < 0,05$), porém os valores das velocidades e BCF foram menores ($P < 0,05$). Houve efeito do tempo nas características de movimento espermático ($P < 0,05$), exceto para STR. Não houve efeito da centrifugação e nem do tempo quanto às características morfológicas dos espermatozoides refrigerados, esta só diferiu entre os ganhões ($P < 0,05$). Por sua vez, a integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial espermáticas foram maiores nos sêmen centrifugado

($P < 0,05$) e suas porcentagens decresceram com o tempo ($P < 0,05$). A peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide refrigerado aumentou somente nas primeiras 24h ($P < 0,05$) e não foi influenciada pela centrifugação. Conclui-se que a centrifugação e a retirada do plasma seminal melhoram a qualidade do sêmen refrigerado eqüino, principalmente em garanhões com baixa longevidade, sendo esta influenciada pelas características iniciais da morfologia espermática. Ainda, tempo de refrigeração induz a um declínio da qualidade seminal. E, por fim, a peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide parece não ser a principal causa de alterações da integridade das membranas e do potencial de membrana mitocondrial durante a refrigeração do sêmen eqüino.

Palavras-chave: Eqüinos. Sêmen refrigerado. Centrifugação. Membranas. Peroxidação.

ABSTRACT

RAPHAEL, C.F. **Effects of centrifugation on motion characteristics, membranes integrity and lipid peroxidation of equine cooled spermatozoon.** [Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide eqüino refrigerado]. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Equine cooled semen is frequently used, although the longevity for some stallions is low. During the cooling process the spermatozoon can be affected by several factors that can cause loss of plasma membrane integrity, acrosomal damage and mitochondrial dysfunctions, resulting in irreversible loss of motility and fertilizing capacity. The composition and concentration of seminal plasma could cause harmful effects to the sperm, being semen centrifugation an alternative to minimize these effects. This experiment was designed to verify the effects of the centrifugation in motion characteristics, membranes integrity and lipid peroxidation of cooled equine sperm to 5°C until 72 hours. Five ejaculates from four stallions were collected. The semen was evaluated for volume and concentration, then split in two treatments, no centrifugation (N) and with centrifugation (W) (300g/10min). Both were diluted in the final concentration 30×10^6 spermatozoa/mL in a skin milk extender and then cooled. The following analyses were performed: the sperm motion characteristics (CASA), morphology (DIC), plasma and acrosomal membranes integrity (PI/FITC-PSA), mitochondrial membrane potential (JC-1) and membrane lipid peroxidation (C11-BODIPY^{581/591}), the last three analyses were assessed in flow cytometry. The analyses were performed in time 0 and 24, 48 and 72 hours after cooling. The experimental design was random blocks with repeated-measures. The data were analyzed by the SAS program, submitted to analysis of variance and the interactions by the test of Greenhouse-Geisser at the level of 5% of significance. The values were larger in W semen for total and progressive motility, ALH, STR and LIN ($P < 0,05$), however the values of the three types of speed and BCF were smaller ($P < 0,05$). There was effect of time in the motion characteristics of sperm ($P < 0,05$), except for STR. There was not any effect of centrifugation and time for the morphologic characteristics of cooled spermatozoa, that only differed among stallions ($P < 0,05$). On the other hand, the sperm integrity of plasma and acrosomal membranes and the potential of mitochondrial membrane were larger in W semen ($P < 0,05$) and their percentages decreased within time ($P < 0,05$). The membrane lipidic peroxidation of the cooled sperm only

increased in the first 24 hours ($P<0,05$) and it was not influenced by centrifugation. In conclusion, the centrifugation and withdrawal of the seminal plasma improve semen quality of the cooled equine sperm, mainly in stallions with low longevity, which is influenced by the initial characteristics of sperm morphology. Moreover, time of cooling induces a decline of seminal quality. Finally, the membrane lipidic peroxidation of the cooled sperm seems not to be the main cause of alterations in the sperm integrity of plasma and acrosomal membranes and the potential of mitochondrial membrane during the cooling of equine semen.

Key words: Equine. Cooled Semen. Centrifugation. Membranes. Peroxidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química do C11-BODIPY ^{581/591}	47
Figura 2 -	Propriedades fluorescentes do C11-BODIPY ^{581/591} e seus produtos oxidados.....	48
Figura 3 -	Fotografia em microscopia confocal de espermatozóides bovinos (esq.) e eqüinos (dir.) induzidos e corados com C11-BODIPY ^{581/591}	49
Figura 4 -	Esquema Experimental	59
Figura 5 -	Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozóides eqüinos refrigerados	74
Figura 6 -	Exemplos de gráfico de densidade e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozóides eqüinos refrigerados.....	75
Figura 7 -	Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise d peroxidação lipídica da membrana espermática dos espermatozóides eqüinos refrigerados	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação das células de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal, detectadas pelas sondas PI e FITC-PSA, respectivamente - Pirassununga - 2007	55
Quadro 2 -	Classificação das células de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda JC-1 - Pirassununga - 2007.....	55
Quadro 3 -	Classificação das células de acordo com peroxidação lipídica da membrana espermática utilizando sonda C11-BODIPY ^{581/591} - Pirassununga - 2007	57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da motilidade total dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	64
Gráfico 2 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da motilidade progressiva dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	65
Gráfico 3 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da velocidade de trajeto (VAP) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	67
Gráfico 4 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da velocidade progressiva (VSL) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	68
Gráfico 5 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da velocidade curvilinear (VCL) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	69
Gráfico 6 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	70
Gráfico 7 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da frequência de batimentos flagelares (BCF) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	71
Gráfico 8 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da retilinearidade (STR) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	71
Gráfico 9 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da linearidade (LIN) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	72
Gráfico 10 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão dos defeitos totais dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	73
Gráfico 11 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão da porcentagem de dos defeitos totais dos espermatozóides refrigerados do garanhão G3, nos dois tratamentos, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	73

Gráfico 12 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão das membranas plasmática e acrossomal intactas (PIAI) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	75
Gráfico 13 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão de membrana plasmática lesada (PL) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	77
Gráfico 14 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão de acrossomo lesado (AL) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	78
Gráfico 15 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão de alto potencial de membrana mitocondrial (APM) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	79
Gráfico 16 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão de peroxidação da membrana dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	81
Gráfico 17 -	Valores das médias $\pm$ erro padrão de peroxidação da membrana dos espermatozóides refrigerados de cada ganhão (G1, G2, G3 e G4), submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de variância para delineamento com 2 tratamentos, 4 garanhões e 4 diferentes tempos de amostragem - Pirassununga - 2007.....	60
Tabela 2 -	Médias $\pm$ erro padrão do volume do ejaculado (sem gel), concentração e características do movimento espermático do sêmen a fresco - Pirassununga - 2007	63
Tabela 3 -	Médias $\pm$ erros padrão da motilidade total dos espermatozóides de cada garanhão nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	64
Tabela 4 -	Médias $\pm$ erro padrão das motilidade total (%) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	65
Tabela 5 -	Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem da motilidade progressiva dos espermatozóides de cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	66
Tabela 6 -	Médias $\pm$ erro padrão das motilidade progressiva (%) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	66
Tabela 7 -	Médias $\pm$ erro padrão da velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	67
Tabela 8 -	Médias $\pm$ erro padrão da velocidade progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	68
Tabela 9 -	Médias $\pm$ erro padrão da velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	69
Tabela 10 -	Médias $\pm$ erro padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	70
Tabela 11 -	Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem de defeitos dos espermatozóides de cada garanhão - Pirassununga - 2007.....	72
Tabela 12 -	Médias $\pm$ erros padrão de espermatozóides com membranas plasmática e acrossomal intactas em cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.	76

Tabela 13 -	Médias $\pm$ erro padrão das membranas plasmática e acrossomal intactas (PIAI; %) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	76
Tabela 14 -	Médias $\pm$ erros padrão de espermatozóides com membrana plasmática lesada em cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.	77
Tabela 15 -	Médias $\pm$ erro padrão das membranas plasmática lesadas (PL; %) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	78
Tabela 16 -	Médias $\pm$ erro padrão de membrana acrossomal lesada (AL; %) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	79
Tabela 17 -	Médias $\pm$ erros padrão dos espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial em cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007	80
Tabela 18 -	Médias $\pm$ erro padrão de alto potencial de membrana mitocondrial (APM; %) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
AL	acrossomo lesado
ALH	amplitude lateral da cabeça
AMPc	adenosinamonofofato cíclica
ANOVA	análise de variância
APM	alto potencial de membrana mitocondrial
ATP	adenosinatrifosfato
BCF	frequência de batimento
BP	filtro <i>Band Pass</i>
Ca^{2+}	íon cálcio
CASA	<i>Computer-Assisted Semen Analysis</i> (Análise Computadorizada do Sêmen)
CAT	catalase
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
cis-PnA	ácido cis-parinárico
Cl^-	íon cloro
CMXRos	cloreto de 8-(4'-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantílio
C11-BODIPY ^{581/591}	4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid
DIC	microscopia de contraste de interferência e diferencial
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPBS	solução tamponada salina de Dulbecco
eptz	espermatozóides
EROs	espécies reativas de oxigênio
EthD-1	homodímero de etídio-1
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	grama
g	gravidade
GPx	glutathione peroxidase

h	horas
H ⁺	íon de hidrogênio
H258	Hoechst 33258
H ₂ O	molécula de água
HO ₂ [•]	radical hidroperoxil
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HOCl	ácido hipocloroso
Hz	Hertz
IA	inseminação artificial
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
K ⁺	íon potássio
kDa	quilodalton
LIN	linearidade
LP	Filtro <i>Long Pass</i>
mg	miligrama
Mg ²⁺	íon magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MT	motilidade total
MPRO	motilidade progressiva
Na ⁺	íon sódio
nm	nanômetro
NRC	National Reseach Concil
O ₂	gás oxigênio
O ₂ ^{•-}	anion superóxido
OH [•]	radicais hidroxil
P	nível de significância
pH	concentração de íons de hidrogênio
PI	iodeto de propídio
PIAI	membranas plasmática e acrossomal intactas
PL	membrana plasmática lesada
PNA	aglutinina de <i>Arachis hypogea</i>

PSA	aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
ROO ⁻	radical peroxil
RO [•]	radical alcoxil
R123	Rodamina 123
s	segundos
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
SOD	superóxido desmutase
STR	retilinearidade
TALP	meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
VAP	velocidade do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva
X-XO	xantina-xantina oxidase

LISTAS DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	percentagem
x	vezes
10 ⁶	milhões
:	para (1:100)
®	marca registrada
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
-	menos / negativo
=	igual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	OBJETIVOS	26
1.2	HIPÓTESE	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO	28
2.1.1	PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA REFRIGERAÇÃO	28
2.1.2	ACONDICIONAMENTO DO SÊMEN PARA REFRIGERAÇÃO	29
2.1.3	SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO	29
2.1.4	TAXAS DE REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO	30
2.1.5	TEMPERATURA FINAL DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN EQUINO	31
2.1.6	TEMPO FINAL DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN EQUINO	32
2.2	DILUIÇÃO DO SÊMEN PARA REFRIGERAÇÃO	32
2.3	PLASMA SEMINAL	35
2.4	EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO E RETIRADA DO PLASMA SEMINAL	37
2.5	EFEITO DO GANHÃO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN	39
2.6	INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL	40
2.6.1	INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA	41
2.6.2	INTEGRIDADE DA MEMBRANA ACROSSOMAL	43
2.6.3	POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL	43
2.6.4	ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES	44
2.7	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	LOCAL	51
3.2	ANIMAIS	51
3.3	COLHEITA E ANÁLISES DO SÊMEN ANTES DA REFRIGERAÇÃO	51
3.3.1	ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO	52
3.3.2	ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA	53
3.3.3	ANÁLISES DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	53

3.3.3.1	Testes para o Ajuste do Citômetro de Fluxo	53
3.3.3.2	Análises do Experimento no Citômetro de Fluxo	54
3.3.4	ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA	55
3.3.4.1	Testes para o Ajuste da Concentração de C11-BODIPY ^{581/591}	56
3.3.4.2	Teste do Momento da Indução	56
3.3.4.3	Análises do Experimento no Citômetro de Fluxo	57
3.4	REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN	57
3.5	ANÁLISES DO SÊMEN APÓS REFRIGERAÇÃO.....	58
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4	RESULTADOS	62
4.1	ANÁLISE DO SÊMEN A FRESCO.....	62
4.2	ANÁLISE DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO.....	63
4.2.1	MOTILIDADE TOTAL (MT)	63
4.2.2	MOTILIDADE PROGRESSIVA (MPRO).....	65
4.2.3	VELOCIDADE DE TRAJETO (VAP).....	66
4.2.4	VELOCIDADE PROGRESSIVA (VSL)	67
4.2.5	VELOCIDADE CURVILINEAR (VCL).....	69
4.2.6	AMPLITUDE DO DESLOCAMENTO LATERAL DA CABEÇA (ALH).....	70
4.2.7	FREQÜÊNCIA DE BATIMENTOS FLAGELARES (BCF)	71
4.2.8	RETILINEARIDADE (STR)	71
4.2.9	LINEARIDADE (LIN)	72
4.3	ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	72
4.4	ANÁLISES DA INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	74
4.4.1	MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL INTACTAS (PIAI).....	75
4.4.2	MEMBRANA PLASMÁTICA LESADA (PL)	76
4.4.3	MEMBRANA ACROSSOMAL LESADA (AL)	78
4.4.4	ALTO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (APM).....	79
4.5	ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA	80
5	DISCUSSÃO	84
6	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXOS	108

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A refrigeração e transporte do sêmen de garanhões, para posterior inseminação artificial (IA), são práticas rotineiras na criação de eqüinos. O uso do sêmen refrigerado teve grande progresso nos últimos anos, principalmente após a liberação desta biotécnica pela maioria das associações de criadores, e também pela alta proporção de garanhões que não respondem adequadamente ao processo de congelação.

O Brasil é o segundo país que mais utiliza o sêmen refrigerado. Assim, o desenvolvimento de técnicas adequadas para preservação e armazenamento de sêmen é de extrema importância, uma vez que possibilita o melhor aproveitamento de animais de grande potencial genético (PAPA et al., 2005).

A utilização do sêmen refrigerado apresenta outras vantagens. Primeiramente quanto à economia financeira que proporciona ao proprietário, uma vez que o custo de transporte do sêmen é menor do que de um animal e, também, por eliminar gastos com hospedagem e possíveis acidentes. Quanto ao bem estar animal, por reduzir o estresse da égua e, se houver, do potro. E quanto ao aspecto sanitário, por diminuir doenças sexualmente transmissíveis ou ocasionadas pela exposição à patógenos estranhos ao animal (BRINSKO; VARNER, 1992)

Infelizmente, existe uma grande variação individual entre os garanhões na manutenção da viabilidade espermática durante o armazenamento do sêmen refrigerado. Para alguns garanhões, mesmo aplicando os cuidados necessários durante todo procedimento, os espermatozóides que sobrevivem à refrigeração são insuficientes para garantir um número adequado de espermatozóides viáveis para IA (BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000).

Outro importante fator que pode interferir na qualidade do sêmen refrigerado é a falta de padronização na preparação do sêmen para transporte no Brasil. A manipulação do sêmen muitas vezes é feita por práticos sem conhecimento da técnica de refrigeração do sêmen eqüino ou por veterinários que não a dominam. Alguns enviam doses de sêmen com baixa concentração e/ou motilidade, sujidades, diluidores inadequados, curvas de refrigeração irregulares, além do transporte em recipientes inadequados (MACEDO, 2005).

Estudos vêm sendo realizados no intuito de aumentar a longevidade do sêmen refrigerado eqüino e manter seu potencial fertilizante por vários dias. Afinal, quanto mais tempo o potencial fertilizante do sêmen refrigerado possa ser estendido, mais fácil será manejo das receptoras a serem inseminadas (BATELLIER et al., 2001).

Existem diversas variáveis envolvidas com a longevidade e viabilidade espermática do sêmen refrigerado, como o tipo de diluidor utilizado, os diferentes protocolos de refrigeração, metodologias de transporte, além de fatores físicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos inerentes ao próprio espermatozóide e suas características de membranas (ALMEIDA, 2004).

O processamento do sêmen para a refrigeração aumenta o número de fatores que podem danificar a membrana plasmática do espermatozóide. Apesar do sêmen refrigerado a 5°C por 24h manter, quase sempre, a fertilidade similar ao sêmen fresco, quando o sêmen é armazenado por períodos maiores, há um declínio marcante da motilidade e taxa de fertilidade (AURICH, 2005). O estresse oxidativo pode ser uma das possíveis causas deste declínio, uma vez que os espermatozóides são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), além de possuírem uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados na membrana plasmática susceptíveis à peroxidação lipídica, e apresentarem limitada capacidade de defesa antioxidante (STRADAIOLI; MAGISTRINI, 2002).

Apesar do plasma seminal conter vários componentes protetores à célula espermática, este também é apontado como uma das causas da baixa fertilidade do sêmen refrigerado por mais de 24 horas. O espermatozóide de alguns garanhões pode apresentar uma maior sensibilidade a algumas substâncias do plasma seminal, que se acentua durante um longo período de armazenamento sob refrigeração. Assim, alguns procedimentos, como a centrifugação do sêmen, podem ser realizados para reduzir a quantidade de plasma seminal, no intuito de melhorar a sobrevivência do espermatozóide submetido à refrigeração (SQUIRES et al., 1999).

Deste modo, o desenvolvimento de pesquisas visa melhorar a compreensão das variáveis que interferem na longevidade do sêmen refrigerado equino. Assim, uma análise mais detalhada da utilização de processamentos variados do sêmen submetido à refrigeração, pode evidenciar uma melhoria da viabilidade espermática em alguns garanhões, permitindo o armazenamento do seu sêmen por um período maior, o que facilita o manejo reprodutivo da criação equina.

1.1 OBJETIVOS

Analisar os efeitos da centrifugação e retirada da maior parte do plasma seminal sobre o movimento espermático, morfologia espermática, integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial da membrana mitocondrial e peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide equino submetido à refrigeração a 5°C e armazenado por até 72 horas.

1.2 HIPÓTESE

A centrifugação e retirada do plasma seminal influenciam, ao longo do tempo, as características do movimento espermático, morfologia espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e peroxidação lipídica da membrana espermática durante a refrigeração a 5°C.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O espermatozóide é exposto a vários fatores que danificam a membrana plasmática e induzem a morte celular, mesmo durante a ejaculação e no trato genital feminino, porém, o processamento do sêmen para refrigeração e inseminação artificial aumenta estes fatores deletérios (AURICH, 2005). Por isso, alguns tópicos importantes serão revisados a seguir, para um melhor entendimento das possíveis alterações que podem influenciar na viabilidade e longevidade do sêmen eqüino refrigerado.

2.1 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO

À temperatura corporal o metabolismo espermático é máximo, e continua alto na temperatura ambiente. Porém, com a queda de temperatura há uma redução no metabolismo, sendo que a cada 10°C de queda, o metabolismo reduz em cerca de 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo são necessários para sua sobrevivência quando comparado à preservação a 38°C. Desta forma, a refrigeração reduz a atividade metabólica do espermatozóide, reduzindo também o crescimento microbiano e conseqüentemente mantém a viabilidade do sêmen por um maior período de tempo (KATILA, 1997; SQUIRES et al., 1999).

2.1.1 PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA REFRIGERAÇÃO

Todo material que entrará em contato com o sêmen precisa estar aquecido, limpo e seco. Após a colheita do sêmen, o mesmo precisa ser avaliado rapidamente quanto a motilidade e concentração iniciais. A seguir, o diluidor aquecido é adicionado ao sêmen, de forma a obter a concentração espermática para a refrigeração, sendo a ideal 25×10^6 eptz/mL, podendo variar até 100×10^6 espermatozoides/mL. Se a concentração inicial for baixa,

recomenda-se diluir 1:1(sêmen:diluidor), centrifugar o sêmen (400 a 500g / 9 a 18 min), remover o sobrenadante e adicionar o diluidor para a concentração desejada (KATILA, 1997).

Jasko (1994) recomenda que padrões mínimos sejam estipulados para o ejaculado ser submetido à refrigeração, como concentração espermática maior que 60×10^6 eptz/mL e motilidade progressiva maior que 40% após a diluição.

2.1.2 ACONDICIONAMENTO DO SÊMEN PARA REFRIGERAÇÃO

Originalmente a recomendação para o acondicionamento do sêmen foi em bolsas de polietileno estéreis (Whirl-Pak[®]) (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). O uso de revestimentos plásticos para mamadeira infantil se tornou comum, porém algumas marcas podem ser espermiotóxicas (KATILA, 1997). Atualmente encontram-se disponíveis no mercado bolsas plásticas específicas para o acondicionamento de sêmen.

Ainda, o sêmen pode ser acondicionado em seringas estéreis, porém o revestimento plástico do êmbolo precisa ser retirado, pois pode liberar substâncias tóxicas ao espermatozóide (BRINSKO; VARNER, 1992), ou em tubos de polietileno estéreis.

O espermatozóide consegue usar vias metabólicas aeróbias ou anaeróbias para sua sobrevivência. No entanto, o acesso permanente ao oxigênio pode causar efeitos deletérios nas membranas espermáticas devido à peroxidação lipídica. A remoção do ar do recipiente de armazenamento do sêmen é benéfica para a sobrevivência espermática em baixas temperaturas (KATILA, 1997). Já, Batellier et al (1998) obtiveram bons resultados de prenhez com sêmen equino armazenado a 15°C em condições aeróbicas.

2.1.3 SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO

A refrigeração do sêmen pode ser feita em sistemas ativos ou passivos. Os sistemas ativos, embora possuam taxas de refrigeração pré-determinadas, são caros e de pouca utilidade prática em condições de campo. Já os passivos possuem a vantagem de ser mais

baratos, porém possuem taxa de refrigeração dependente de fatores como a temperatura ambiente, volume e temperatura inicial da amostra (VALLE et al., 1999).

O sistema passivo de refrigeração do sêmen é o mais utilizado para eqüinos, sendo feito em dispositivos (*containers*) de refrigeração, que devem atender às seguintes exigências: completo isolamento térmico do meio exterior, obtenção de taxa de refrigeração lenta (ideal = $-0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$), manutenção da temperatura pelo maior tempo possível após a estabilização ($4-8^{\circ}\text{C}$), proteção do sêmen, estrutura forte, que permita o uso de diferentes meios de transportes, ser barato, leve e de fácil manuseio (SILVA FILHO; PALHARES; FONSECA, 1994).

Existem diversos modelos de dispositivos de refrigeração nacionais e internacionais, com diferentes taxas de refrigeração, temperatura final e tempo máximo de armazenamento.

Dentre os internacionais podemos citar: Equitainer I[®], Equitainer II[®], ExpectaFoal[®], Bio-Flite[®], Lane STS[®], Equine Express[®], Bio-Flite[®], Foal Flight[®], Celle[®], Sarstedt[®], Salsbro Box[®].

O Equitainer[®], desenvolvido por Douglas-Hamilton et al. (1984) é o mais conhecido; sua taxa de refrigeração inicial é de aproximadamente $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$, e em 10 horas atinge a temperatura final de aproximadamente 5°C , a mantendo por 30 a 50h. De acordo com o fabricante seu tempo máximo de armazenamento é de aproximadamente 70h. Apesar de ser muito resistente e poder ser reutilizado, seu alto custo de aquisição e a necessidade de retorno ao haras de origem, podem dificultar sua utilização (BRINSKO et al., 2000).

Modelos de dispositivos de refrigeração nacionais estão com aceitação crescente devido ao menor preço e maior facilidade de aquisição. O Botu-Box[®] e Max-Sêmen Express[®] têm temperatura final de aproximadamente 15°C e tempo máximo de armazenamento de 24h, enquanto, o Botutainer[®], tem temperatura final de aproximadamente 5°C e tempo máximo de armazenamento de 48h.

2.1.4 TAXAS DE REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQÜINO

A taxa de refrigeração deve ser controlada durante o procedimento de refrigeração do sêmen. O sêmen pode ser refrigerado rapidamente ($0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de 37 a 19°C . Durante a faixa de temperatura entre 19°C a 8°C , a refrigeração deve ser lenta ($0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$), devido à

sensibilidade ao choque frio. Abaixo de 8°C a refrigeração pode ser rápida até a temperatura de armazenamento entre 4 a 6°C (MORAN et al., 1992).

Douglas-Hamilton et al. (1984) verificaram que tanto taxas de refrigeração iniciais superiores a -1°C/min., como taxas de refrigeração muito lentas (<0,05°C/min) eram deletérias para a motilidade e morfologia espermáticas. A partir destes resultados os pesquisadores idealizaram o Equitainer®.

Province et al. (1985) compararam a imersão direta do sêmen em água a 5°C com taxas de refrigeração de -1,0, -0,5 e -0,2°C/min, e verificaram uma redução significativa da motilidade espermática quando o sêmen era submetido diretamente à temperatura de 5°C.

Varner et al. (1988) num estudo com sêmen eqüino refrigerado até 4°C, compararam três curvas de refrigeração, lenta (-0,3°C/min), média (-0,9°C/min) e rápida (-1,3°C/min) quanto a características espermáticas. A curva mais lenta também obteve os melhores resultados.

2.1.5 TEMPERATURA FINAL DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN EQÜINO

Existem algumas diferenças quanto à estrutura da membrana e metabolismo do espermatozóide de acordo com a temperatura na qual o mesmo está mantido. Os lipídeos da membrana espermática estão na fase líquida a 22°C e em gel a 4°C. Esta mudança pode acarretar danos à célula espermática. O metabolismo do espermatozóide a 21°C é de 10 a 20% do metabolismo a 37°C, e a 4°C é de apenas 2 a 7%. A via metabólica a 37°C é aeróbia, assim como a 15°C; já, a 4°C a via de metabolização é anaeróbia (VIDAMENT et al., 2000).

Province et al. (1985) verificaram que o sêmen armazenado a 20°C e 15°C apresentou valores superiores de motilidade espermática do que a 10°C ou 5°C por até 36 horas de refrigeração. Seguindo a mesma linha, Batellier et al. (2001) obtiveram maior longevidade espermática e melhores índices de prenhez quando o sêmen foi armazenado a 15°C do que a 5°C, por 24h.

Varner et al. (1988), Varner et al. (1989) e Kayser et al. (1992) relataram que ao utilizarem temperaturas de armazenamento entre 4-5°C obtiveram maiores valores de motilidade espermática que entre 20-25°C, com 24h de refrigeração. O mesmo foi obtido por Ball (1998) quanto à fertilidade do sêmen, que foi maior no preservado a 5°C do que a 20°C.

Love et al. (2001) também verificaram que a temperatura de armazenamento de 5°C preservou melhor a integridade da cromatina espermática do que a 20°C, até 46 horas de armazenamento do sêmen.

Segundo Batellier et al. (2001), o armazenamento a 15°C pode prevenir os danos à membrana plasmática causados pelo choque frio, principalmente para o sêmen de garanhões que não respondem bem a refrigeração. Os autores recomendam 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. Entretanto, Squires et al. (1999) recomendam que o sêmen pode ser armazenado tanto a 20°C quanto a 5°C quando a IA ocorrer até 12 horas após a colheita; caso o tempo seja superior, o sêmen deve ser refrigerado a 5°C.

2.1.6 TEMPO FINAL DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN EQUINO

A preservação do sêmen por pelo menos 24 horas é importante, para que o mesmo seja transportado e recebido pelos haras para a posterior utilização na IA (SQUIRES et al., 1999).

O armazenamento por longos períodos pode desencadear processos bioquímicos, que podem comprometer a fertilidade, como a capacitação espermática prematura, instabilidade nuclear, perda de componentes intracelulares e peroxidação lipídica das membranas espermáticas (AMANN; GRAHAM, 1993; POMMER; LINFOR; MEYERS, 2002).

Segundo Brinsko e Varner (1992), a capacidade fertilizante do espermatozóide se mantém por 24 a 48 horas ou mais no sêmen refrigerado, e citam que já foi reportada fertilidade normal de espermatozóides armazenados por períodos de 72 a 96 horas.

2.2 DILUIÇÃO DO SÊMEN PARA REFRIGERAÇÃO

A preservação do sêmen por muitas horas não é possível sem a adição de diluidores, responsáveis por prolongar a vida do espermatozóide, uma vez que estabilizam sistemas enzimáticos, mantêm a integridade de membranas, protegem os espermatozóides de danos como choque frio, dos efeitos deletérios do plasma seminal, de produtos tóxicos produzidos

pelos espermatozóides e previnem o crescimento de microorganismos. Além disso, os diluidores aumentam o volume da dose inseminante e possibilitam uma estimativa mais real da motilidade (KATILA, 1997).

Os diluidores utilizados na preservação do sêmen refrigerado podem conter vários componentes, como açúcares, eletrólitos, tampões, antibióticos, gema de ovo, leite e produtos de leite. Os açúcares são utilizados como substratos para produção de ATP pelo espermatozóide, sendo o mais comum a glicose, mas também podem ser usados a frutose, lactose, rafinose, sucrose e piruvato. Os eletrólitos e tampões garantem o controle da osmolaridade e pH. Os antibióticos, como a penicilina, gentamicina e amicacina, previnem o crescimento bacteriano durante o armazenamento do sêmen (JASKO, 1994; KATILA, 1997).

A gema de ovo é utilizada para proteger os espermatozóides do choque frio. Provavelmente essa proteção é devido à presença de lipoproteínas de baixa densidade, porém seu mecanismo exato ainda é obscuro. Dentre as hipóteses sugeridas estão: associação destas lipoproteínas à membrana, a estabilizando; formação de uma película protetora de fosfolípidios na superfície da membrana; reposição dos fosfolípidios da membrana; e competição por sítios de ligação na membrana com peptídeos deletérios (<5kDa) do plasma seminal (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Apesar deste efeito protetor, a gema de ovo contém progesterona, que pode ocasionar uma capacitação espermática precoce e conseqüente redução da fertilidade (LIPAR et al., 1999). Um outro problema é a hidrólise das lecitinas da gema do ovo, resultando na formação de lisolecitina que causa a desestabilização da membrana (RITAR; SALOMON, 1982).

O leite é um fluido biológico de composição complexa, com mais de 100.000 moléculas. Sua proteção parece não estar relacionada aos lipídios, e sim às proteínas e carboidratos, que além de auxiliar no tamponamento fisiológico, também promovem a proteção celular. Dentre os constituintes do leite, as micelas de caseína, principal proteína do leite, são apontadas por proporcionar a maior proteção (BATELLIER et al., 2001; POMMER; LINFOR; MEYERS, 2002; BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Porém, devido à complexidade do leite, este pode conter componentes que podem ser benéficos ou deletérios ao espermatozóide. Além disso, os componentes benéficos à preservação espermática podem não estar presentes em ótimas concentrações, e outros podem ter efeitos negativos no espermatozóide, como demonstrado em estudos mais detalhados com algumas proteínas do leite (BATELLIER et al., 1997; BATELLIER et al., 2001; LEBOEUF et al., 2003). Nestes estudos, a fosfocaseinato nativa, proteína composta por micelas de

caseínas, e β -lactoglobulina, proteína solúvel de maior quantidade no leite, possuem atividade protetora para os espermatozóides, sendo que esta proteção pode ser devido a uma possível ação antioxidante destas proteínas. No entanto, a α -lactoalbumina, outra proteína solúvel, foi prejudicial à sobrevivência dos espermatozóides. Baseado nestes estudos foi desenvolvido um diluidor a base de uma solução de sais e suplementado com a fosfocaseinato nativa (INRA 96[®]).

Contudo, a maioria dos meios utilizados para diluição de sêmen refrigerado equino é constituída basicamente de leite em pó desnatado, glicose e antibiótico, como primeiramente relatado por Kenney et al. (1975).

Alguns componentes podem ser adicionados ao diluidor no intuito de melhorar a preservação de características espermáticas. Adição de substâncias quelantes, como o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), que se ligam ao Ca^{2+} e Mg^{2+} , reduz a perda de íons intracelulares, amenizando as lesões causadas pelo choque térmico (AMANN; GRAHAM, 1993). A adição de antioxidantes é útil para preservar a motilidade e a integridade da membrana espermática, aumentando a longevidade do sêmen (AURICH et al., 1997; BRUEMMERT et al., 2002; ALMEIDA; BALL, 2005). O uso de indutores de funcionalidade, como as metilxantinas (teofilina, cafeína e pentoxifilina) aumentam a motilidade espermática, devido a um aumento intracelular de AMPc (MARQUES et al.; 2002; GOULART et al., 2004). Os aminoácidos, como a glicina e taurina, também já tiveram sua eficiência comprovada na manutenção da motilidade e viabilidade do sêmen refrigerado (CARVALHO, 2003).

Existem vários diluidores disponíveis comercialmente, estes diferem principalmente em relação à composição de antibióticos e açúcares (SQUIRES et al., 1999). Dentre os diluidores produzidos nacionalmente encontram-se o Botu-Sêmen[®], Botu-Turbo[®], Max-Sêmen[®], Max-Sêmen Plus[®] e o Equimix[®]. As versões Turbo e Plus são indicadas para garanhões com baixa resistência a refrigeração, por serem acrescidas de componentes que aumentam a motilidade e melhoram a sobrevivência do espermatozóide.

2.3 PLASMA SEMINAL

A porção fluída do ejaculado, na qual os espermatozóides estão presentes, é conhecida como plasma seminal. Existem vários componentes orgânicos e inorgânicos no plasma, como aminoácidos, proteínas, íons (Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , entre outros), bicarbonato, frutose, sorbitol, inositol, ergotiomina, glicerilfosforilcolina, ácido cítrico, ácido ascórbico, lipídeos, enzimas, antimicrobianos, imunoglobulinas e uma variedade de substâncias hormonais, todos em quantidades variadas (GARNER; HAFEZ, 2004).

O plasma seminal é constituído de uma mistura de secreções derivadas do testículo, epidídimo e glândulas acessórias (TROEDSSON et al., 2005).

As secreções do trato reprodutivo não são descarregadas simultaneamente durante a ejaculação. Desta maneira, o ejaculado do garanhão consiste em cinco a oito jatos (frações), formados como resultado de contrações uretrais. Estas frações diferem entre si por sua composição bioquímica, sendo que 70% dos espermatozóides estão presentes nos três primeiros jatos. A primeira fração é derivada das glândulas bulbouretrais, é translúcida e geralmente não contém espermatozóides. Em seguida vem a fração rica em espermatozóides, juntamente com secreções prostáticas e ampolares. A terceira fração é a fração pobre em espermatozóides, com secreções das vesículas seminais. As últimas frações praticamente não contêm espermatozóides e têm poucas secreções das ampolas e vesículas seminais (VARNER, 1987; KARESKOSKI et al., 2006).

O volume do ejaculado do garanhão é 10 a 20 vezes maior do que o de touros, e 50 a 100 vezes maior do que o do carneiro, porém o número total de espermatozóides por ejaculado é similar nas três espécies. Assim, a contribuição do plasma seminal no sêmen do garanhão é muito maior do que no touro ou carneiro (VARNER, 1987).

O plasma seminal serve como meio para os espermatozóides atingirem o trato reprodutivo feminino. Seus componentes estão relacionados com a função e fertilidade espermática, podendo ser benéficos ou deletérios para o espermatozóide (JASKO et al., 1992; BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Alguns componentes do plasma seminal são importantes para o desenvolvimento e maturação espermáticos no trato reprodutivo masculino. No trato feminino, o plasma seminal participa do transporte e eliminação dos espermatozóides. A presença de substâncias moduladoras da inflamação uterina pós-cobertura no plasma seminal, auxilia na eliminação

dos espermatozóides e na limpeza uterina de éguas suscetíveis a endometrite. Ainda, durante a inflamação, algumas proteínas seminais protegem espermatozóides viáveis, enquanto outras facilitam a fagocitose de espermatozóides danificados. Prostaglandinas (PGF_{2α} PGE) e estrógenos presentes no plasma seminal podem auxiliar no transporte do espermatozóide (TROEDSSON et al., 2005), assim como a ocitocina (KATILA, 2001). Além disso, há presença de vesículas ricas em colesterol (prostasomos) que bloqueiam seu efluxo da membrana plasmática (MINELLI et al., 1998), substâncias antioxidantes capazes de minimizar os efeitos da peroxidação lipídica da membrana (MCNIVEN; RICHARDSON, 2006) e fatores envolvidos na capacitação e reação acrossomal (MOORE et al., 2005a).

Porém, o plasma seminal não é o meio ideal para a preservação dos espermatozóides. Apesar de existirem variações entre ganhões na sensibilidade do espermatozóide ao plasma seminal, grandes proporções acarretam na redução da motilidade espermática durante um longo período de armazenamento sob refrigeração, enquanto pequenas quantidades melhoram sua sobrevivência (JASKO et al., 1991; BRINSKO; VARNER, 1992; SQUIRES et al., 1999). Segundo Kareskoski et al. (2005), a primeira fração do ejaculado contém uma alta concentração de cloro e sódio que pode ser deletério para a manutenção da motilidade durante a refrigeração.

No plasma seminal de bovinos foi identificada uma família de proteínas ligadoras a fosfolipídios, chamada de BSP, que apesar de ter várias ações relacionadas à fertilização, são danosas à preservação espermática, pois induzem ao efluxo de lipídios da membrana plasmática. Assim, a exposição contínua do espermatozóide ao plasma seminal, causa uma remoção contínua de colesterol da membrana plasmática, deixando o espermatozóide muito sensível durante sua preservação. Proteínas homólogas foram isoladas do plasma seminal de ganhões, a HSP-1, HSP2 e HSP-12, sendo encontrada aproximadamente 2,0 mg/mL, correspondendo a 20% do total de proteínas do plasma. Os efeitos deletérios destas proteínas são minimizados quando são adicionados diluidores a base de gema de ovo ou leite, pois estes contêm, lipoproteínas ou caseínas, respectivamente, que sequestram estas proteínas deletérias do plasma seminal, prevenindo o efluxo de lipídio da membrana, influenciando positivamente a refrigeração e congelamento do espermatozóide (BERGERON; MANJUNATH, 2006).

Os efeitos prejudiciais do plasma seminal podem ser minimizados através da colheita fracionada, alta diluição ou centrifugação do sêmen. Na colheita fracionada somente é utilizada a fração rica em espermatozóides. Altas diluições, como 3:1 (diluidor: sêmen) é o método mais utilizado, porém ganhões oligospermicos não são beneficiados. A

centrifugação é um método rotineiramente utilizado no protocolo da criopreservação do sêmen equino, para concentrar a fração espermática e amenizar os efeitos do plasma seminal (JASKO et al., 1991; BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000).

2.4 EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO E RETIRADA DO PLASMA SEMINAL

A centrifugação pode causar efeitos no sêmen, como redução na motilidade e perda de espermatozóides (10 a 30 %), porém ambos variam de acordo com a temperatura, diluidor, volume, tempo e força de centrifugação e volume do sobrenadante deixado no sedimento (JASKO et al., 1991; VIDAMENT et al., 2000).

A força e o tempo de centrifugação podem influenciar também a integridade de membrana. Dell'aqua Jr. et al. (2001) testaram três forças de centrifugação (600g, 800g e 1000g) e tempos (3min, 5min e 10min) quanto a motilidade e integridade de membrana. Os autores encontraram valores significativamente menores ($P < 0,05$) nas forças de 800g e 1000g por 10 min, e concluíram que, dentre as técnicas avaliadas, a melhor é a de 600g/10min.

Padilla e Foote (1991) compararam o sêmen refrigerado a 4°C por até 72 horas, com ou sem plasma seminal, retirado por centrifugação, e diluído somente em diluidor a base de leite ou neste suplementado com meio de *Tyrode* modificado. Os autores observaram que a motilidade dos espermatozóides diluídos em diluidor a base de leite suplementado com *Tyrode* modificado, foi superior. Porém, quando o plasma seminal foi mantido, este tratamento teve motilidade diminuída, sugerindo uma possível interação entre os componentes do diluidor e o plasma seminal.

Resultados semelhantes foram encontrados por Webb e Arns (1995) e Rigby et al. (2001), sendo que os últimos recomendam o uso deste diluidor suplementado no sêmen de garanhões que necessitam de centrifugação devido a baixa concentração espermática, ou cujo plasma seminal precisa ser removido devido a prováveis efeitos tóxicos na viabilidade do sêmen refrigerado.

Jasko et al. (1991) relataram que a centrifugação juntamente com a remoção total do plasma seminal e adição de diluidor a base de leite aumentaram a motilidade espermática. Porém, em estudo posterior (JASKO et al., 1992), a remoção total do plasma seminal apresentou valores de motilidade menores do que a manutenção de 5-20% de plasma seminal,

sendo este adicionado ao diluidor, o que sugere que baixas concentrações de plasma seminal ou sua substituição é essencial para a manutenção da motilidade espermática.

Moore, Squires e Graham (2005a) verificaram que a exposição do sêmen por 15 minutos a diferentes concentrações de plasma seminal, entre 0 a 80%, antes da criopreservação, não interferiu na motilidade total, progressiva e integridade da membrana plasmática. Neste mesmo estudo, a incubação por 2 a 6h com 20% de plasma seminal foi deletéria à motilidade espermática quando comparada à preservação com 5%.

Todd et al. (2001) testaram cinco concentrações de plasma seminal (0%, 1,25%, 2,5%, 5%, 10% e 20%) na manutenção da motilidade progressiva do espermatozóide refrigerado por até 48h, e constataram os melhores valores para 1,25% e 2,5% após 24h e para as concentrações menores que 5% após 48h ($P<0,05$). Já, Keller et al. (2001) utilizaram três concentrações de plasma seminal (1,95%, 6,29% e 17,78%) no sêmen preservado a 4°C por até 72h, e constataram melhores valores de motilidade na menor concentração e também nas amostras centrifugadas. Entretanto, Schmitt et al. (2003) não encontraram efeito significativo de quatro concentrações de plasma seminal (0%, 2,5%, 5% e 10%) na motilidade.

Brinsko, Crockett e Squires (2000) constataram que a centrifugação com posterior remoção do plasma seminal é benéfica principalmente para garanhões cujo ejaculado sofre uma redução acentuada da motilidade progressiva espermática quando processado da maneira convencional, especialmente para sêmen refrigerado por mais de 24h. O mesmo foi encontrado por Fogal et al. (2006).

Estudos realizados com sêmen diluído com diluidores diferentes, centrifugado (600g/10min) e refrigerado 5°C, relatam uma melhor manutenção da qualidade espermática por até 96h (CARVALHO, 2003; MACEDO, 2005).

Love et al. (2005) obtiveram melhor preservação da motilidade espermática e da integridade do DNA no espermatozóide refrigerado por até 48h na ausência de plasma seminal, sendo que diluidor a base de leite com suplementação de sais obteve melhores resultados do que o sem suplementação.

Webb e Humes (2006) comparam a motilidade do sêmen equino refrigerado por até 72h em três diluidores comerciais (Keney, INRA 96[®], VMD-Z[®]), submetidos ou não à centrifugação para remoção do plasma seminal. Não houve aumento significativo da motilidade espermática quando o plasma seminal foi removido, porém maiores valores foram encontrados para os espermatozóides em diluidor a base de sais com suplementação de

proteína do leite (INRA 96[®]) e sem o plasma seminal, sugerindo que combinação entre o procedimento e o diluidor pode influenciar na motilidade do sêmen refrigerado.

Pagl et al. (2006), utilizando diluidor a base de proteínas do leite, verificaram porcentagens maiores de espermatozóides móveis no sêmen centrifugado, porém não houve diferença quanto à velocidade espermática. Os autores sugerem que as características do movimento individual dos espermatozóides não são afetadas pela centrifugação.

Serres et al. (2002) relatam que a motilidade e a integridade da membrana plasmática de espermatozóides jumentos submetidos à centrifugação (400g/7min) foram melhor preservadas durante a refrigeração por até 96h.

2.5 EFEITO DO GARANHÃO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

Dentre os animais das espécies domésticas, o cavalo é o que mais se assemelha aos humanos no que diz respeito à clínica da reprodução. Os cruzamentos de cavalos raramente incluem a fertilidade como um critério de seleção, isto acarreta num número significativo de reprodutores com baixo desempenho reprodutivo ou subfêrteis (LOOMIS, 2006).

A seleção de reprodutores geralmente é feita pelo padrão racial e performance atlética, o que leva à utilização de garanhões subfêrteis. Apesar das características reprodutivas terem herdabilidade moderada, a utilização destes garanhões pode perpetuar na população genes particularmente indesejáveis sob o aspecto reprodutivo (AMANN; GRAHAM, 1993).

A performance reprodutiva de um garanhão depende de vários fatores inter-relacionados, dentre eles o manejo, a fertilidade das éguas inseminadas, presença de patógenos venéreos, libido, habilidade de monta e qualidade seminal (AMANN, 2005).

Com a finalidade de maximizar a performance reprodutiva, a utilização de métodos avançados para o processamento e seleção do sêmen de garanhões, são boas ferramentas para o uso de sêmen de baixa qualidade ou para obter espermatozóides para programas de reprodução assistida (LOOMIS, 2006).

Variações individuais entre os garanhões, como na composição do plasma seminal e das membranas espermáticas, podem interferir na manutenção da motilidade espermática e integridade da membrana plasmática durante o processo de refrigeração, podendo ocasionar

redução na taxa de fertilidade (BATELLIER et al., 2001; BRINSKO et al., 2005; MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005a; KARESKOSKI et al., 2006).

A influência do plasma seminal heterólogo na motilidade espermática no sêmen refrigerado e congelado já foi detectada por alguns autores, sendo notado um efeito benéfico na adição de plasma seminal de garanhões com alta motilidade ao ejaculado de garanhões com baixa motilidade (AURICH et al., 1996; VIANNA et al 2002; MATTOS et al., 2003).

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 recomendado a inseminação logo após a colheita (AURICH, 2005).

De acordo com a suscetibilidade do sêmen a refrigeração, Brinsko, Crockett e Squires (2000) classificaram o ejaculado dos garanhões como de alta e baixa qualidade. Os garanhões com sêmen de baixa qualidade apresentam redução superior a 40% da motilidade progressiva inicial após 24 horas de armazenamento.

Metcalf (1998), ao usar sêmen refrigerado na inseminação artificial, verificou que a qualidade do ejaculado interferia nas taxas de prenhez. O autor analisou a motilidade progressiva, morfologia espermática, número de espermatozóides viáveis e concentração, então classificou o sêmen em excelente, bom, regular ou ruim, que obtiveram índices de gestação de 87,5% (14/16), 62% (18/29), 33% (6/18) e 11% (2/18), respectivamente.

2.6 INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL E POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Testes funcionais, como a análise da motilidade e o teste hiposmótico, e diferentes métodos de coloração podem determinar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide (AURICH, 2005). Porém, a avaliação compartimentada da membrana plasmática e da mitocôndria é mais recomendada, uma vez que a integridade das membranas é essencial para a manutenção da viabilidade, enquanto que a atividade mitocondrial é necessária para gerar energia para o batimento flagelar, hiperativação e penetração do espermatozóide no oócito. Diferentes corantes fluorescentes podem ser utilizados para avaliar

a viabilidade espermática e atividade mitocondrial, com o uso da microscopia de fluorescência ou por citometria de fluxo (PAPAIOANNOU et al., 1997).

2.6.1 INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A membrana plasmática do espermatozóide é composta por uma dupla camada de lipídeos, proteínas e carboidratos (AMANN; GRAHAM, 1993). Os principais lipídeos são os fosfolipídeos, compostos por uma alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados, que garantem a fluidez da membrana, os esteróis, sendo o principal o colesterol, e os glicolipídeos (PARKS; LYNCH, 1992; FLESCHE; GADELLA, 2000). As proteínas, integrais ou periféricas, atuam como bombas de cálcio, sódio e outros íons, e como receptores associados a interações ao oócito (GRAHAM, 1996). Já os carboidratos, encontrados na superfície da membrana plasmática, são responsáveis pela adesão entre as células, como a do espermatozóide e o ovócito (ALBERTS, 1999).

A membrana plasmática é responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico celular, atuando como uma barreira entre os meios intra e extracelulares. Danos nesta estrutura, que é a mais afetada pelo choque frio, podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMANN; PICKETT, 1987; AMANN; GRAHAM, 1993).

Na temperatura corpórea a membrana plasmática está na forma de um mosaico fluido de lipídeos e proteínas. As proteínas se movem livremente na bicamada de fosfolipídios, sendo esta movimentação necessária na funcionalidade da membrana (JASKO, 1994). Com a redução da temperatura os lipídeos da membrana passam de um estado fluido, 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 (AMANN; GRAHAM, 1993). Este evento é chamado de fase de transição lipídica e ocorre em uma temperatura específica para cada tipo lipídeo. Em eqüinos, a fase de transição dos fosfolipídeos ocorre por volta dos 20,7°C (PARKS; LYNCH, 1992). Esta mudança restringe a mobilidade das proteínas da membrana, alterando sua funcionalidade. Com a continuidade do declínio da temperatura, o arranjo da bicamada pode não ser mais mantido, resultando na ruptura da membrana (JASKO, 1994).

A susceptibilidade dos espermatozoides aos danos causados pelo choque frio difere entre as espécies, e provavelmente está associada à composição lipídica da membrana plasmática. A resistência ao choque frio é maior em espécies cuja membrana espermática é

caracterizada por uma maior concentração de colesterol. No espermatozóide equino foi encontrada uma taxa menor entre colesterol e fosfolípídeo do que no bovino, mas maior do que no suíno (PARKS; LYNCH, 1992). O colesterol reduz a temperatura da fase de transição, mantendo as membranas em estado fluido em temperaturas menores, reduzindo assim os danos à membrana plasmática. A adição de colesterol nos espermatozóides eqüinos antes da criopreservação aumentou as porcentagens de espermatozóides móveis e com membranas intactas, o nível de colesterol nas membranas espermáticas, assim como a habilidade do espermatozóide em se ligar à zona pelúcida (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005b).

Após atingir a maturidade, o espermatozóide, perde a maioria de suas organelas e a transcrição do DNA é cessada, sendo impossível sintetizar novos componentes da membrana plasmática. Assim, danos à mesma resultam em irreversível perda de sua função (EDDY; O'BRIEN, 1994). Portanto, a integridade da membrana plasmática é fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAM, 1992).

A determinação da integridade da membrana plasmática pode ser feita com a utilização de corantes fluorescentes (sondas) impermeáveis à membrana, com afinidade ao DNA, assim as células não coradas são consideradas com membrana plasmática intacta. O Hoeschst 33258 (H258), YoPro-1, iodeto de propídio (PI), homodímero de etídio-1 (EthD-1) ToPro-1 e TOTO são exemplos destas sondas. Uma outra alternativa é o uso de sondas acetiladas, que por conter radicais acetil conseguem passar na membrana intacta, sendo imediatamente desacetiladas por esterases intracelulares, tornando a sonda impermeável. Assim, as células intactas apresentam coloração, porém é possível haver ligação sondas a células deterioradas com membrana lesada. Exemplos destas sondas são o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e SYBR-14. É possível utilizar simultaneamente as sondas, como SYBR-14 ou CFDA com PI ou EthD-1, para detectar células com membrana plasmática intacta e lesada, respectivamente (AURICH, 2005; SILVA, GADELLA, 2006).

O PI é bastante utilizado, isoladamente ou associado a outras sondas, devido a sua facilidade de preparação e aplicação, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana corada. Esta sonda possui afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GRAHAM et al., 1990; ARRUDA, 2000; ARRUDA; CELEGHINI, 2003).

2.6.2 INTEGRIDADE DA MEMBRANA ACROSSOMAL

O acrossomo é uma estrutura de dupla parede, situada na cabeça do espermatozóide, entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo (GARNER, HAFEZ; 2004). Nele estão contidas as enzimas acrossomais, que são liberadas durante reação acrossômica, um evento essencial para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito. Portanto, para que ocorra a fertilização é necessária a integridade do acrossomo e a manutenção de suas enzimas (FLESCHE; GADELLA, 2000).

Para a determinação da integridade do acrossomo têm-se utilizado as lecitinas conjugadas a fluoróforos; marcadores de lisossomos, cujo pH é semelhante a do acrossomo (*Lysotracker dyes*); ou anticorpos anti proteína intra-acrossomal (antiCD46). As lecitinas conjugadas se ligam especificamente a cadeias de carboidratos de glicoproteínas presentes no acrossomo. As mais utilizadas são a do *Psium sativum* (PSA), *Arachis hypogea* (PNA) e *Concanavalia ensiformis* (ConA). Em eqüinos a PSA se liga a glicoproteínas da matriz acrossomal (α -manose e α -galactose) e a PNA da membrana externa do acrossomo (β -galactose). Estas aglutininas também se ligam não-especificamente a alguns componentes da membrana plasmática, porém acredita-se que a PNA se ligue menos. Dentre os fluoróforos conjugados às lecitinas, o mais utilizado é o isotiocionato de fluoresceína (FITC) (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; SILVA; GADELLA, 2006).

A PSA conjugada ao FITC (FITC-PSA) marca o acrossomo espermático em verde amarelado, facilitando sua visualização e identificando acrossomos lesados, podendo ser aplicado aos espermatozoides eqüinos (FARLIN et al., 1992; CASEY et al., 1993; ARRUDA, 2000; CELEGHINI et al., 2004; NASCIMENTO 2006).

2.6.3 POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Nas células espermáticas as mitocôndrias estão dispostas de forma helicoidal na peça intermediária. Sua principal função é a produção de ATP por fosforilação oxidativa. O ATP é o suplemento energético para os batimentos flagelares, sendo indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (COSSON, 1996).

Porém, a importância da mitocôndria na motilidade espermática foi reconsiderada recentemente. Os espermatozóides no ejaculado a fresco produzem a maior parte do ATP por glicólise (produção anaeróbia de ATP); o deslizamento de tubulina dependente de ATP, responsável pela motilidade espermática, é feito na parte distal do flagelo, ficando longe da mitocôndria; a bainha fibrosa da cauda contém enzimas envolvidas na glicólise, cujo *knock out* em ratos deixou-os imóveis; espermatozóides submetidos a drogas que interferem na fosforilação oxidativa, continuam móveis e vivos; mitocôndria paternas não estão envolvidas em nenhum evento após a fertilização. Contudo, as mitocôndrias provavelmente geram o ATP para a peça intermediária e cabeça do espermatozóide, necessário na manutenção das membranas. Assim, a integridade da funcionalidade da mitocôndria seria importante para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea ou nas técnicas de reprodução assistida (SILVA; GADELLA, 2006).

Indicadores do potencial de membrana de mitocôndrias têm sido utilizados nas pesquisas, especialmente as sondas fluorescentes, que têm muito sucesso em células vivas, principalmente por não serem destrutivas nem causarem toxicidade (REERS; SMITH; CHEN, 1991). As sondas mais utilizadas são a Rodamina 123 (R123) e os corantes da linha Mitotracker[®]: Deep Red, Red, Orange, Green, Orange CM-H₂TMROS, X-Rosamine CM-H₂XRos e o JC-1 (SILVA; GADELLA, 2006).

O JC-1 identifica populações mitocondriais com diferentes potenciais de membrana. Sua cor é alterada reversivelmente do verde para o laranja esverdeado ou vermelho, com o aumento do potencial de membrana (REERS; SMITH; CHEN, 1991). Esta sonda vem sendo utilizada com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial da célula espermática equina (GRAVANCE et al., 2000, 2001; CELEGHINI et al., 2004; NASCIMENTO, 2006).

2.6.4 ASSOCIAÇÃO DE SONDAS FLUORESCENTES

A associação de sondas fluorescentes, de forma a permitir a avaliação simultânea dos três componentes celulares citados, é de fundamental importância para separar uma população de células que apresente características desejáveis para que sejam capazes de fertilizar o ovócito (CELEGHINI et al., 2007). Diversas associações de sondas foram utilizadas por

diferentes pesquisadores nos últimos anos (GRAHAM et al., 1990; HARRISON; VICKERS, 1990; GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998; SOUZA, 2001; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; ARRUDA et al, 2005; SIEME et al., 2006; ANDRADE et al., 2007).

A análise simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial da membrana mitocondrial no espermatozóide eqüino foi obtida por Celeghini et al. (2004) quando utilizaram uma associação das sondas fluorescentes PI, FITC/PSA e MITO na microscopia de epifluorescência, sendo esta avaliação muito prática e de fácil preparo.

Celeghini et al. (2007), preconizando a avaliação simultânea de uma mesma célula espermática bovina, de forma clara e fácil, testaram e validaram quatro técnicas de associação de sondas para bovinos, analisadas no microscópio de epifluorescência. Dentre as técnicas validadas (PI, FITC-PSA e MITOTRACKER GREEN FM; PI, FITC-PSA e CMXRos ou PI, FITC-PSA e JC-1), a autora concluiu ser a associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1 a melhor para ser utilizada, já que esta permite separar duas populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara.

A partir destes resultados, Nascimento (2006) utilizou com sucesso a associação do PI, FITC-PSA e JC-1 para análise, por microscopia de epifluorescência, do sêmen equino criopreservado.

As sondas fluorescentes também podem ser utilizadas na citometria de fluxo, que é um sistema que avalia células em suspensão isoladamente, podendo obter facilmente informações de subpopulações em uma amostra, o que o faz ideal para análises de populações heterogêneas, como os espermatozóides (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). Sua análise é objetiva, avaliando a quantia de sondas fluorescentes que estão associadas às células de maneira precisa, sendo que pode ser feita em dezenas de milhares de células em aproximadamente um minuto e ainda permite a associação de sondas fluorescentes no espermatozóide (GRAHAM, 2001).

2.7 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA

O espermatozóide, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produz espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo a maior parte delas originadas do metabolismo normal da célula. Dentre as EROs formadas, podemos citar o anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), hidroperóxil ($\text{HO}_2^\bullet$), peróxil ($\text{ROO}^\bullet$) e alcóxil ($\text{RO}^\bullet$), e ainda o ácido hipocloroso (HOCl) (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE et al., 1997).

No plasma seminal existem enzimas e algumas moléculas com ação antioxidante, tais como a glutathione peroxidase, superóxido desmutase, catalase, vitamina E, vitamina C, uratos, albumina, taurina, hipotaurina, entre outras. Ball et al. (2000) verificaram que a atividade da CAT no sêmen equino é bem mais alta do que em outras espécies, aproximadamente 1000U/mL.

Esses agentes controlam a produção de pró-oxidantes, como as EROs, prevenindo possíveis danos celulares. Porém, na presença de um grande número de células inflamatórias e espermatozóides defeituosos, ou em procedimentos que diminuam acentuadamente a quantidade de plasma seminal, há um aumento na produção de EROs (BAUMBER et al., 2000; AITKEN, 2004)

Ball, Vo e Baumber (2001) comprovaram a produção de H_2O_2 por espermatozóide equino *in vitro* durante sua incubação em condições aeróbicas, sendo que esta produção foi aumentada em cinco vezes nos espermatozóides danificados por *flash-frozen*. Também foi encontrada uma maior produção em espermatozóides anormais, caracterizados por uma baixa motilidade e alta proporção de gotas citoplasmáticas proximais e problemas de peça intermediária. Os autores crêem que a produção de EROs por espermatozóides danificados ou anormais pode contribuir com a fertilidade reduzida e problemas relacionados à preservação do sêmen.

A produção excessiva de EROs, além da capacidade antioxidante do sêmen, determina o estresse oxidativo, que causa disfunções na própria célula espermática através de diferentes mecanismos, como a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, inibição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004).

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 decosaheptaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais na membrana plasmática, com perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, mudanças no metabolismo celular e, por fim, perda da capacidade de fertilização do espermatozóide (AITKEN; KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002).

Apesar desses efeitos prejudiciais, a produção de espécies reativas de oxigênio faz parte do funcionamento normal da célula espermática, uma vez que baixas concentrações de EROs estão envolvidas com a hiperativação dos espermatozóides, sendo sua produção um pré-requisito para capacitação espermática, além de ser relacionada à ligação com a zona pelúcida e fusão do espermatozóide com o oócito (AURICH et al., 1997; BROUWERS; GADELLA, 2003).

A detecção da peroxidação lipídica do espermatozóide pode ser feita através da detecção de produtos finais deste processo, como o malondialdeído, ou pela avaliação dos lipídios de membrana pela cromatografia. Estes métodos são sensíveis, porém são trabalhosos e medem a peroxidação da membrana de forma indireta. Uma alternativa para verificação da peroxidação lipídica da membrana é a utilização de sondas fluorescentes lipofílicas. A mais amplamente utilizada é um análogo de ácido graxo, o ácido cis-parinárico (cis-PnA), porém sua extrema insaturação o torna mais susceptível à peroxidação lipídica do que os ácidos graxos biológicos. Outras sondas fluorescentes utilizadas são as derivadas de fluoresceína e lipídios (PAP et al, 1999; BALL; VO, 2002).

A sonda fluorescente BODIPY[®] (4,4-difluoro-3a,4adiaza-s-indacene) tem uma intensidade de fluorescência intrinsecamente lipofílica, podendo mimetizar as propriedades de lipídeos naturais. A partir dele, foi desenvolvida uma família de sondas com análogos de ácidos graxos, fosfolipídios e ésteres de colesterol, dentre eles está o BODIPY[®] 581/591 C₁₁ (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid), cuja estrutura química está representada na figura 1 (MOLECULAR PROBES INCORPORATION, 2003).

Figura 1- Estrutura química do C11-BODIPY^{581/591}

A sonda fluorescente BODIPY[®] 581/591 C₁₁ (C11-BODIPY^{581/591}-Molecular Probes[®]) é um análogo de ácidos graxos polissaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto está intacta, é observada uma fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 580 a 620 nm. Já, na presença de EROs, ocorre a peroxidação lipídica, que acarreta na mudança da fluorescência de vermelha para verde, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm. Devido a estas características, esta sonda é uma maneira prática para detectar peroxidação lipídica e capacidade de oxidação de células vivas, inclusive de espermatozóides, podendo ser utilizada na citometria de fluxo ou em outros aparelhos com leitores a *laser* (BALL; VO, 2002; BROUWERS; GADELLA, 2003; NEILD et al., 2005).

Estudos utilizando espectrofotometria de massa relatam que esta sonda também pode ser peroxidada por espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito. Assim, a sonda peroxidada por peroxinitrito emite uma fluorescência laranja e por EROs a fluorescência verde, como demonstrado no esquema abaixo (Figura 2) (DRUMEN et al., 2004; BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005).

(Fonte: //BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005)

Figura 2 - Propriedades florescentes do C11-BODIPY^{581/591} e seus produtos oxidados

Esta sonda também pode ser utilizada para localizar a peroxidação lipídica no espermatozóide, sendo esta análise realizada por microscopia a laser confocal. Estudos com espermatozóides bovinos, suínos e eqüinos demonstraram que a peroxidação lipídica ocorre principalmente na peça intermediária, em menor proporção na parte posterior da cauda e praticamente ausente na cabeça do espermatozóide (BROUWERS; GADELLA, 2003;

BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005; NEILD et al., 2005). Abaixo estão exemplificadas fotografias desta técnica em espermatozóides induzidos à peroxidação lipídica (Figura 3).

(Fonte: BROUWERS; GADELLA, 2003; NEILD et al., 2005)

Figura 3 - Fotografia em microscopia confocal de espermatozóides bovinos (esq.) e eqüinos (dir.) induzidos e corados com C11-BODIPY^{581/591}

3 Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologias do Sêmen e Andrologia, situado no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), Campus de Pirassununga, SP.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados quatro garanhões de sela, com idades entre 4 a 17 anos, conhecidamente férteis, pertencentes ao Setor de Equideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS), SP. Todos foram mantidos sob as mesmas condições de manejo, sendo alojados em baias e soltos individualmente em piquetes apropriados três vezes por semana e alimentados com feno, capim, concentrado e sal mineral de acordo com as indicações do NRC.

3.3 COLHEITA E ANÁLISES DO SÊMEN ANTES DA REFRIGERAÇÃO

Foram realizadas cinco colheitas de sêmen de cada garanhão. O pênis foi previamente higienizado, com algodão umedecido em água a 33°C, e as colheitas foram feitas em vagina artificial modelo Missouri, com o auxílio de “égua-manequim” em estro, devidamente contida.

Após a colheita, o sêmen foi encaminhado rapidamente para o laboratório, onde foi feita sua filtração para a separação da fração gelatinosa, mensuração do volume do ejaculado

sem o gel (mL), cálculo da concentração espermática ($\times 10^6$ eptz/mL) e análise computadorizada do movimento espermático, sendo esta descrita adiante (item 3.3.1).

Em seguida o sêmen foi dividido em dois tratamentos, sendo que um foi submetido à centrifugação, ambos diluídos com diluidor base de leite (Botu-Sêmen[®] -Biotech Botucatu). O sêmen que permaneceu sem centrifugação (S) foi diluído a 30×10^6 eptz/mL. Já, o sêmen submetido à centrifugação (C) foi diluído 1:1 (sêmen: diluidor), acondicionado em tubos cônicos de 15mL e então centrifugados a 350g/10min (Centrífuga de Bancada Excelsa II, Modelo 206BL, Fanem[®]). Após a centrifugação o sobrenadante foi retirado, no intuito de diminuir a quantidade de plasma seminal, e o sedimento diluído na concentração final de 30×10^6 eptz/mL.

Assim, ficaram estabelecidos dois tratamentos, “S” e “C”. Ambos foram divididos em quatro alíquotas, referentes à análise antes da refrigeração, no tempo 0 (T0), e mais três análises no sêmen refrigerado, explicadas adiante (item 3.5).

3.3.1 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO

Esta análise foi realizada no sêmen diluído a 30×10^6 eptz/mL logo após a colheita e em ambos tratamentos antes da refrigeração. Cinco microlitros de amostra foram colocados na câmara de leitura (Leja[®] standard count, SC20.01.FA, 20 micron), previamente aquecida, e esta amostra foi inserida no aparelho modelo IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorn Research). Este equipamento realiza a análise do sêmen por sistema computadorizado (*Computer-Assisted Semen Analysis – CASA*), sendo que para a análise do movimento espermático utilizou-se o programa *Animal Motility*. Foram previamente realizados ajustes (*set up*) no equipamento para a análise de sêmen equino (Anexo A) e escolha manual do campo de leitura e análise, sendo selecionados no mínimo os 10 melhores campos por amostra.

As características de movimento espermático analisadas foram: motilidade total (MT, %) motilidade progressiva (MPRO, %), 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 flagelares (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

3.3.2 ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Alíquotas de sêmen, de ambos os tratamentos, foram retiradas para análise posterior da morfologia espermática, adicionadas a 0,5mL de solução de formol salino aquecida 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.

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

Antes de começar o experimento foram realizados testes para o ajuste (compensação) do citômetro de fluxo (FACSaria, Beckton-Dickeson®), descritos a seguir (item 3.3.3.1).

3.3.3.1 Testes para o Ajuste do Citômetro de Fluxo

Foram realizados alguns testes para o ajuste do equipamento. Em cada teste o sêmen foi colhido e diluído 1:1 com diluidor. Foram separadas duas amostras de sêmen, com 1mL cada, sendo que uma foi submetida ao *flash frozen*, que são três ciclos de congelação rápida seguida de descongelamento lento, no intuito de lesar os espermatozóides (ARRUDA, 2000). Assim, uma amostra continha a maioria dos espermatozóides íntegros e a outra, a maioria dos espermatozóides lesados. Em seguida, ambos foram subdivididos e corados com iodeto de propídio (PI-0,5mg/mL, Sigma-Aldrich), FITC-PSA (100µg/mL, Sigma-Aldrich), PI + FITC-PSA, e JC-1 (153µM, Molecular Probes), cujos protocolos estão descritos adiante (item 3.3.3.2). As amostras coradas foram encaminhadas para o citômetro de fluxo. Primeiramente foram analisadas as amostras com PI, para que assim fosse determinado o local específico

(*gate*) onde a maioria dos espermatozóides se encontrava no gráfico gerado pela análise da amostra, sendo que este *gate* foi estipulado como padrão para todas as análises seguintes. Então foram analisadas as amostras com FITC-PSA, PI + FITC-PSA, e JC-1. Assim, todas as sondas foram ajustadas no aparelho.

Ainda, foram realizadas análises das mesmas amostras no microscópio de epifluorescência (Modelo Eclipse 80i, Nikon[®]), somente para comparação dos resultados. Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados mais coerentes entre ambas análises. Assim, o melhor ajuste obtido para cada sonda foi estipulado como padrão, para que fossem possíveis as análises do experimento.

3.3.3.2 Análises do Experimento no Citômetro de Fluxo

Amostras de 1mL de sêmen, de ambos os tratamentos, foram retiradas, diluídas em 1mL de solução de TALP *sperm* (BAVISTER et al., 1983) (Anexo B), e centrifugadas a 300g/10min (Minicentrífuga Modelo Mini Spin Plus, Eppendorf) O sobrenadante foi retirado e o sedimento rediluído em TALP à 25×10^6 eptz/mL.

Então, foram retiradas duas alíquotas de 150μL desta amostra e cada uma foi acondicionada em um microtubo de 1,5mL, sendo que em um foi adicionado 3μL de PI e 80μL de FITC-PSA, para analisar, respectivamente, a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e no outro tubo 6μL de JC-1, para analisar o potencial de membrana mitocondrial (Anexo C). As amostras coradas foram incubadas por 8min, na temperatura ambiente e protegidas da luz.

Por fim, as amostras foram adicionadas com 600μL de TALP, a fim de diminuir a concentração espermática por mL, em seguida, foram transferidas para tubos cônicos de 15mL, devido ao suporte da plataforma do citômetro de fluxo.

Para realizar a análise foi utilizado o *laser* de argônio (Modelo Sapphire 488-20, Coherent[®]) e os filtros C (*Long Pass* 595nm / *Band Pass* 610/20nm), D (*LP* 556nm / *BP* 575/26nm) e E (*LP* 502nm / *BP* 530/30nm). Em cada amostra foram analisadas 10.000 células, classificadas em diferentes categorias como mostram os quadros a seguir (Quadro1 e 2).

CATEGORIAS QUANTO A INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL	SIGLAS
Membranas Plasmática e Acrossomal Intactas	PIAI
Membranas Plasmática Intacta e Acrossomal Lesada	PIAL
Membranas Plasmática Lesada e Acrossomal Intacta	PLAI
Membranas Plasmática e Acrossomal Lesadas	PLAL

Quadro 1 - Classificação das células de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal, detectadas pelas sondas PI e FITC-PSA, respectivamente - Pirassununga - 2007

CATEGORIAS QUANTO AO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	SIGLAS
Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	APM
Médio Potencial de Membrana Mitocondrial	MPM
Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	BPM

Quadro 2 - Classificação das células de acordo com o potencial de membrana mitocondrial, detectado pela sonda JC-1 - Pirassununga - 2007

Vale salientar que a metodologia desta análise é uma adaptação das metodologias utilizadas por Celeghini et al. (2004), Celeghini et al. (2007) e Nascimento (2006), uma vez que esta análise foi feita por citometria de fluxo e a dos referidos trabalhos por microscopia de epifluorescência. No citômetro de fluxo utilizado, o filtro de leitura da fluorescência do PI e do FITC-PSA é o mesmo do alto e do baixo potencial (JC-1), respectivamente, o que impossibilita o uso simultâneo, uma vez que os comprimentos de onda destas sondas se sobrepõem, podendo comprometer a análise. Assim, optou-se por utilizar o JC-1 separadamente.

3.3.4 ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA

A peroxidação lipídica da membrana espermática foi avaliada com a sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591}, baseada nas técnicas usadas por Ball e Vo (2002) e Neild et al. (2005). Também foram realizados alguns testes para adequação (itens 3.3.4.1 e 3.3.4.2).

3.3.4.1 Testes para o Ajuste da Concentração de C11-BODIPY^{581/591}

Foram testadas três concentrações da sonda: 2 μ M, 6 μ M ou 10 μ M. Nestes testes o sêmen foi diluído em diluidor (1:1), centrifugado (300g/10min), o sobrenadante retirado, o sedimento diluído a 200 x10⁶ eptz/mL em TALP modificado (TALP-APV), sendo que neste a soro-albumina bovina (BSA) foi substituída por álcool polivinílico (APV, 1mg/mL - Sigma-Aldrich), uma vez que a BSA atua como um agente antilipoperoxidativo (ALVAREZ; STOREY, 1995).

Então o sedimento diluído em TALP-APV foi separado em 3 tubos, cada um com 1mL de amostra, onde foi adicionada 1 μ L (2 μ M), 3 μ L (6 μ M) ou 5 μ L (10 μ M) de C11-BODIPY^{581/591} e incubadas por 30min a 38°C. Após a incubação as amostras foram novamente centrifugadas (300g/20min), o sobrenadante retirado, o sedimento diluído a 50 x10⁶ eptz/mL em TALP-APV. Estas foram subdivididas em duas alíquotas, denominadas controle e induzida. As amostras foram induzidas à peroxidação lipídica com Cumene Hidroperóxido (7,5mM, Sigma-Aldrich®) e Sulfato de Ferro (0,64mM, Fisher®). A seguir foram avaliadas no microscópio de epifluorescência e no citômetro de fluxo. Na epifluorescência em todas as amostras prevalecia um *back ground* vermelho que impossibilitou as análises. Na citometria, após o ajuste para cada concentração de sonda, as análises foram realizadas. Como não houve diferença quanto a concentração de sonda utilizada, optou-se pela concentração de 2 μ M.

3.3.4.2 Teste do Momento da Indução

Este teste foi realizado para certificar que a sonda também detectaria a peroxidação, se esta ocorresse após a incorporação da sonda. Para isso, utilizamos um protocolo semelhante ao teste anterior, só que todas as amostras continham 2 μ M C11-BODIPY^{581/591} e a indução foi feita em dois diferentes momentos, antes ou após a adição da sonda. Como os resultados das análises, realizadas por citometria, não diferiram, foi certificado que esta sonda é capaz de identificar a peroxidação lipídica da membrana espermática mesmo quando esta já tenha ocorrido.

3.3.4.3 Análises do Experimento no Citômetro de Fluxo

As amostras já diluídas previamente, foram centrifugadas a 300g/10min, o sobrenadante retirado e o sedimento diluído com 400 µL de TALP-APV. Em seguida, foi feito o cálculo de concentração das soluções, e delas retiradas uma alíquota, sendo que esta foi adicionada ao TALP-APV, de forma a obter, para cada tratamento, uma solução de 1mL com 100×10^6 eptz/mL, onde foi adicionada 1µL de C11-BODIPY^{581/591} (2µM). As amostras coradas foram incubadas por 30min, a 38°C e protegidas da luz. Após a incubação foi realizada outra centrifugação (300g/10min), a fim de retirar o excesso de sonda presente no sobrenadante, e o sedimento foi diluído com 900µL de TALP-APV. A seguir, 400µL desta solução foi transferida para outro microtubo, que continha 600µL de TALP-APV.

Por fim, 50µL desta última solução foram adicionados em 450µL de TALP-APV, acondicionado em tubos cônicos de 15mL, e estes foram inseridos no citômetro de fluxo. Foi utilizado o *laser* de argônio e os filtros C (LP 595nm / BP 610/20nm) e E (LP 502nm / BP 530/30nm). Em cada amostra foram analisadas 10.000 células, classificadas em três categorias como mostra o quadro a seguir (Quadro 3).

CATEGORIAS QUANTO A PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA	SIGLAS
Peroxidada	Perox
Média Peroxidação	MediaPerox
Sem Peroxidação	SemPerox

Quadro 3 - Classificação das células de acordo com peroxidação lipídica da membrana espermática utilizando sonda C11-BODIPY^{581/591} - Pirassununga - 2007

3.4 REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN

As amostras de cada tratamento (“S” e “C”) foram acondicionadas em bolsas de polietileno estéreis (Whirl-Pak[®], Nasco), com retirada da maior parte do ar, e submetidas à refrigeração a 5°C, realizada no Equitainer I[®] (Hamilton-Thorn Research), que permaneceu a temperatura ambiente.

Como foram realizadas três análises em tempos distintos (24, 48 e 72h), foram utilizados três Equitainer I[®], cada um com uma amostra de cada tratamento, de forma que o dispositivo só foi aberto no momento da análise, uma vez que sua temperatura interna é afetada ao abri-lo. Assim, garantiu-se uma uniformidade entre as amostras, já que todas permaneceram nas mesmas condições.

3.5 ANÁLISES DO SÊMEN APÓS REFRIGERAÇÃO

Foram feitas três análises do sêmen após a refrigeração, nos tempos 24, 48 e 72 horas (T24, T48 e T72, respectivamente). As amostras, uma de cada tratamento, foram retiradas dos dispositivos de refrigeração e submetidas à análise computadorizada do movimento espermático, análise da morfologia espermática, análises da integridade de membranas plasmática e acrossomal, do potencial de membrana mitocondrial e da peroxidação lipídica da membrana espermática, segundo as técnicas descritas anteriormente (itens 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3.2 e 3.3.4.3). Todo procedimento experimental pode ser visualizado na figura a seguir (Figura 4).

Figura 4- Esquema Experimental

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em blocos generalizados, sendo que cada garanhão foi considerado como um bloco. Foi utilizado o complemento de delineamento medidas repetidas no tempo. A unidade experimental foi metade do ejaculado.

Os resultados das médias e seus respectivos erros padrão foram apresentados em gráficos e tabelas. Os dados foram analisados empregando-se o programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2001). Primeiramente foi verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias. Os valores que não respeitaram as premissas foram transformados em arco-seno. Foi realizada análise de variância para verificar os efeitos dos tratamentos, bloco e tempo. As interações principais foram determinadas pelo teste de Greenhouse-Geisser. Como teste complementar para comparação de médias foi utilizado o teste de Tukey. As hipóteses testadas foram consideradas significativas ao nível de 5 %.

A tabela da análise de variância está representada a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise de variância para delineamento com 2 tratamentos, 4 garanhões e 4 diferentes tempos de amostragem - Pirassununga - 2007

Fonte de Variação	Grau de Liberdade
Tratamento	1
Garanhão (bloco)	3
Resíduo A	35
Parcela	39
Tempo	3
Tempo * tratamento	3
Tempo * bloco	9
Resíduo B	105
Sub-parcela	159

4 Resultados

4 RESULTADOS

Primeiramente será demonstrado os resultados obtidos nas avaliações realizadas no sêmen a fresco (item 4.1) e depois os resultados para cada análise no sêmen submetido à refrigeração (itens 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

4.1 ANÁLISE DO SÊMEN A FRESCO

Os dados sobre o sêmen a fresco serviram somente como um indicador da qualidade seminal dos garanhões a cada colheita, não objetivando a comparação entre animais.

Os valores médios e erros padrão do volume do ejaculado (sem o gel), concentração e características do movimento espermático de cada garanhão, denominados G1, G2, G3 e G4, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Médias $\pm$ erro padrão do volume do ejaculado (sem gel), concentração e características do movimento espermático do sêmen a fresco - Pirassununga - 2007

Características	Garanhão			
	G1 (n=5)	G2 (n=5)	G3 (n=5)	G4(n=5)
Volume (mL)	60,0 $\pm$ 7,4	49,0 $\pm$ 4,3	79,0 $\pm$ 8,1	107,0 $\pm$ 15,0
Concentração (x10⁶ eptz/mL)	186,0 $\pm$ 33,9	91,5 $\pm$ 25,9	61,0 $\pm$ 7,6	91,5 $\pm$ 10,7
MT¹ (%)	83,8 $\pm$ 4,4	82,0 $\pm$ 3,8	60,0 $\pm$ 3,1	84,8 $\pm$ 3,7
MPRO² (%)	18,6 $\pm$ 2,7	36,4 $\pm$ 2,0	15,6 $\pm$ 1,9	32,6 $\pm$ 2,4
VAP³ (μm/s)	153,8 $\pm$ 11,0	128,6 $\pm$ 7,3	126,4 $\pm$ 2,8	150,5 $\pm$ 5,3
VSL⁴ (μm/s)	86,8 $\pm$ 5,5	95,3 $\pm$ 4,5	77,2 $\pm$ 2,3	105,3 $\pm$ 4,0
VCL⁵ (μm/s)	279,0 $\pm$ 24,9	242,9 $\pm$ 15,7	217,7 $\pm$ 7,0	264,3 $\pm$ 7,9
ALH⁶ (μm)	7,7 $\pm$ 0,8	7,9 $\pm$ 0,6	6,0 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 0,3
BCF⁷ (Hz)	37,7 $\pm$ 2,9	38,2 $\pm$ 2,3	41,0 $\pm$ 1,3	40,1 $\pm$ 0,9
STR⁸ (%)	57,6 $\pm$ 3,5	74,6 $\pm$ 2,2	64,4 $\pm$ 1,5	71,0 $\pm$ 1,1
LIN⁹ (%)	33,6 $\pm$ 2,5	41,6 $\pm$ 1,2	38,6 $\pm$ 1,5	42,6 $\pm$ 1,2

MT¹: motilidade total; MPRO²: motilidade progressiva; VAP³: velocidade de trajeto; VSL⁴: velocidade progressiva; VCL⁵: velocidade curvilinear; ALH⁶: deslocamento lateral da cabeça ; BCF⁷: frequência de batimento flagelar; STR⁸: retilinearidade e LIN⁹: linearidade.

4.2 ANÁLISE DO MOVIMENTO ESPERMÁTICO

A seguir serão demonstrados os resultados obtidos para cada característica do movimento espermático no sêmen antes (0h) e até 72h após a refrigeração.

4.2.1 MOTILIDADE TOTAL (MT)

Não houve interação entre tempo e tratamento (P=0,0995), mas os efeitos isolados de

tempo ($P<0,0001$) e tratamento ($P=0,0192$) foram significativos. Os valores médios da MT foram maiores no centrifugado (C) e diminuíram com o passar do tempo (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da motilidade total dos espermatozoides equinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Houve interação entre tempo e garanhão (bloco) ($P=0,0007$). Os garanhões obtiveram diferentes valores de MT nos diferentes tempos, sendo a MT decrescente e com queda mais acentuada a partir de 48h (T48) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias $\pm$ erros padrão da motilidade total dos espermatozoides de cada garanhão nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão			
	G1	G2	G3	G4
T0	81,7 $\pm$ 2,6 ^{aA}	84,1 $\pm$ 1,3 ^{aA}	63,6 $\pm$ 4,0 ^{bA}	84,7 $\pm$ 1,3 ^{aA}
T24	74,8 $\pm$ 3,3 ^{aAB}	64,3 $\pm$ 5,0 ^{aB}	35,6 $\pm$ 6,0 ^{bB}	67,4 $\pm$ 3,2 ^{aB}
T48	68,6 $\pm$ 2,9 ^{aB}	50,6 $\pm$ 5,5 ^{aB}	27,3 $\pm$ 4,9 ^{bB}	61,5 $\pm$ 5,7 ^{aB}
T72	24,2 $\pm$ 4,3 ^{aC}	8,5 $\pm$ 2,5 ^{bC}	5,4 $\pm$ 1,4 ^{bC}	34,4 $\pm$ 5,7 ^{aC}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P<0,05$).

Como houve um efeito significativo do garanhão ($P<0,0001$), abaixo encontra-se uma tabela somente para visualização dos valores da MT de cada animal (Tabela 4), não objetivando a comparação entre os valores, visto que não houve interação tempo e tratamento.

Tabela 4 - Médias $\pm$ erro padrão das motilidade total (%) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos -Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	83,0 $\pm$ 2,8	80,4 $\pm$ 4,7	82,4 $\pm$ 1,9	85,8 $\pm$ 1,8	64,2 $\pm$ 6,3	63,0 $\pm$ 5,7	85,0 $\pm$ 3,2	84,4 $\pm$ 4,5
T24	74,0 $\pm$ 6,0	75,6 $\pm$ 3,3	55,2 $\pm$ 8,2	73,4 $\pm$ 2,3	24,0 $\pm$ 9,0	47,2 $\pm$ 3,9	63,6 $\pm$ 5,8	71,2 $\pm$ 2,6
T48	69,0 $\pm$ 3,0	68,2 $\pm$ 5,5	50,6 $\pm$ 10,3	50,6 $\pm$ 5,3	19,0 $\pm$ 8,0	35,6 $\pm$ 3,1	51,0 $\pm$ 10,8	70,0 $\pm$ 2,5
T72	25,4 $\pm$ 4,2	23,0 $\pm$ 8,0	6,2 $\pm$ 3,0	10,8 $\pm$ 4,1	2,2 $\pm$ 1,2	8,6 $\pm$ 1,6	34,0 $\pm$ 9,8	34,8 $\pm$ 7,0

4.2.2 MOTILIDADE PROGRESSIVA (MPRO)

Semelhante ao anterior, não houve interação entre tempo e tratamento ($P=0,0617$), mas houve efeito isolado de tempo (T) ($P<0,0001$) e tratamento (t) ($P=0,0010$). Os valores médios da MPRO foram maiores no C e diminuíram com o passar do tempo (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da motilidade progressiva dos espermatozóides equinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Também houve interação entre tempo e garanhão ($P=0,0098$). As médias da MPRO de cada garanhão, nos diferentes tempos, estão apresentadas na tabela a seguir (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem da motilidade progressiva dos espermatozoides de cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão			
	G1	G2	G3	G4
T0	44,7 $\pm$ 6,0 ^{aA}	42,8 $\pm$ 3,9 ^{aA}	25,9 $\pm$ 2,6 ^{bA}	44,5 $\pm$ 3,5 ^{aA}
T24	34,5 $\pm$ 3,2 ^{aA}	30,8 $\pm$ 4,7 ^{aAB}	10,5 $\pm$ 2,9 ^{bB}	31,0 $\pm$ 4,1 ^{aAB}
T48	30,3 $\pm$ 3,3 ^{aA}	19,0 $\pm$ 3,9 ^{aB}	5,5 $\pm$ 1,5 ^{bBC}	26,2 $\pm$ 4,5 ^{aB}
T72	9,9 $\pm$ 2,5 ^{aB}	2,1 $\pm$ 0,6 ^{bC}	0,9 $\pm$ 0,4 ^{bC}	18,0 $\pm$ 3,9 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Ainda, houve efeito isolado significativo do garanhão ($P < 0,0001$). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 6.

Tabela 6 - Médias $\pm$ erro padrão das motilidade progressiva (%) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	39,8 $\pm$ 11,2	49,6 $\pm$ 5,1	35,6 $\pm$ 4,3	50,0 $\pm$ 4,9	20,6 $\pm$ 2,0	31,2 $\pm$ 3,6	37,8 $\pm$ 4,4	51,2 $\pm$ 3,8
T24	29,4 $\pm$ 3,1	39,6 $\pm$ 4,9	24,8 $\pm$ 7,1	36,8 $\pm$ 5,7	3,0 $\pm$ 1,7	18,0 $\pm$ 2,6	25,8 $\pm$ 5,7	36,2 $\pm$ 5,5
T48	33,4 $\pm$ 2,6	27,2 $\pm$ 6,1	18,2 $\pm$ 7,5	19,8 $\pm$ 3,3	2,2 $\pm$ 1,1	8,8 $\pm$ 2,0	16,5 $\pm$ 4,2	34,0 $\pm$ 6,0
T72	11,6 $\pm$ 4,6	8,2 $\pm$ 2,5	1,4 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 1,1	0,2 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,9	19,0 $\pm$ 6,7	17,0 $\pm$ 4,7

4.2.3 VELOCIDADE DE TRAJETO (VAP)

Houve interação entre tempo e tratamento ($P = 0,0023$). Os valores médios da VAP foram significativamente maiores no sem centrifugação (S) ($P < 0,05$) em todos os tempos, exceto no T72, como pode ser visto no gráfico 3.

Gráfico 3 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da velocidade de trajeto (VAP) dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

O efeito isolado do garanhão também foi significativo ($P < 0,0001$). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, são apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 - Médias $\pm$ erro padrão da velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	122,9 $\pm 17,1^a$	83,2 $\pm 9,4^a$	121,8 $\pm 9,8^a$	108,2 $\pm 10,7^a$	112,6 $\pm 4,2^a$	68,5 $\pm 7,9^b$	137,2 $\pm 9,3^a$	127,8 $\pm 3,7^a$
T24	128,2 $\pm 10,6^a$	91,2 $\pm 9,0^b$	101,7 $\pm 12,7^a$	89,6 $\pm 9,3^a$	67,5 $\pm 9,9^a$	63,5 $\pm 5,9^a$	132,6 $\pm 4,3^a$	105,4 $\pm 6,5^b$
T48	104,8 $\pm 13,9^a$	54,1 $\pm 6,5^b$	99,7 $\pm 12,4^a$	56,9 $\pm 3,2^b$	66,5 $\pm 8,3^a$	51,0 $\pm 3,5^a$	109,6 $\pm 12,7^a$	73,5 $\pm 10,8^a$
T72	65,8 $\pm 5,9^a$	56,2 $\pm 8,7^a$	62,9 $\pm 16,8^a$	59,5 $\pm 9,7^a$	30,0 $\pm 3,5^a$	47,9 $\pm 3,8^a$	82,5 $\pm 13,5^a$	64,01 $\pm 5,4^a$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F ($P < 0,05$)

4.2.4 VELOCIDADE PROGRESSIVA (VSL)

Houve interação entre tempo e tratamento ($P = 0,0083$). Os valores médios da VSL foram maiores no S em todos os tempos, sendo que só foi encontrada diferença significativa

no T48 ($P=0,0001$), porém no T0 houve uma tendência à significância ($P=0,0518$) (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da velocidade progressiva (VSL) dos espermatozoides equinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Também houve efeito isolado do garanhão ($P<0,0001$). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 8.

Tabela 8 - Médias $\pm$ erro padrão da velocidade progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	86,98 $\pm 7,4^a$	65,68 $\pm 5,5^b$	85,24 $\pm 6,1^a$	88,28 $\pm 6,0^a$	75,84 $\pm 2,0^a$	56,58 $\pm 5,7^b$	99,4 $\pm 2,8^a$	103,52 $\pm 3,5^a$
T24	89,82 $\pm 7,9^a$	70,56 $\pm 7,3^a$	69,00 $\pm 9,3^a$	75,40 $\pm 4,0^a$	37,76 $\pm 4,7^a$	49,94 $\pm 4,3^a$	91,62 $\pm 7,1^a$	79,28 $\pm 3,6^a$
T48	77,90 $\pm 9,0^a$	41,74 $\pm 4,8^b$	69,36 $\pm 8,8^a$	44,84 $\pm 1,9^b$	39,96 $\pm 4,9^a$	36,82 $\pm 1,9^a$	71,93 $\pm 10,7^a$	57,00 $\pm 7,5^a$
T72	55,86 $\pm 4,2^a$	47,60 $\pm 7,1^a$	48,54 $\pm 12,5^a$	49,52 $\pm 9,4^a$	22,48 $\pm 11,9^a$	36,52 $\pm 3,8^a$	67,60 $\pm 11,0^a$	53,02 $\pm 5,1^a$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F ($P<0,05$)

4.2.5 VELOCIDADE CURVILINEAR (VCL)

Houve interação entre tempo e tratamento ($P=0,0058$). Os valores médios da VCL foram significativamente maiores no S ($P<0,05$) em todos os tempos, exceto no T72 (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da velocidade curvilínea (VCL) dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Também houve efeito isolado do garanhão ($P<0,0001$). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 9.

Tabela 9 - Médias $\pm$ erro padrão da velocidade curvelínea (VCL; $\mu\text{m/s}$) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	226,3 $\pm 36,6^a$	160,1 $\pm 16,6^a$	223,9 $\pm 16,9^a$	200,3 $\pm 19,2^a$	198,2 $\pm 6,7^a$	123,1 $\pm 14,3^b$	240,9 $\pm 18,8^a$	218,6 $\pm 3,6^a$
T24	231,1 $\pm 17,0^a$	182,4 $\pm 13,8^a$	197,5 $\pm 22,4^a$	179,6 $\pm 20,9^a$	137,5 $\pm 18,2^a$	128,7 $\pm 10,5^a$	246,0 $\pm 2,5^a$	207,8 $\pm 14,3^b$
T48	192,7 $\pm 21,1^a$	118,8 $\pm 13,2^b$	208,1 $\pm 19,7^a$	123,7 $\pm 6,4^b$	143,6 $\pm 13,2^a$	108,3 $\pm 7,5^a$	221,9 $\pm 16,3^a$	151,5 $\pm 20,1^b$
T72	136,8 $\pm 15,3^a$	124,7 $\pm 17,6^a$	139,3 $\pm 38,9^a$	125,4 $\pm 13,4^a$	68,4 $\pm 33,9^a$	106,6 $\pm 7,4^a$	172,1 $\pm 20,1^a$	134,0 $\pm 8,8^a$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F ($P<0,05$)

4.2.6 AMPLITUDE DO DESLOCAMENTO LATERAL DA CABEÇA (ALH)

Houve interação entre tempo e tratamento ($P=0,0111$), sendo que no T24 a diferença foi significativa ($P=0,0211$) e no T72 teve uma tendência à significância ($P=0,057$), sendo que em ambos os valores do C foram maiores, como pode ser visto no gráfico 6.

Gráfico 6 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Também houve efeito isolado do garanhão ($P<0,0001$). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 10.

Tabela 10 - Médias $\pm$ erro padrão da amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; μm) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	6,60 $\pm$ 0,7 ^a	5,86 $\pm$ 0,3 ^a	6,54 $\pm$ 0,5 ^a	6,14 $\pm$ 0,5 ^a	5,52 $\pm$ 0,2 ^a	4,90 $\pm$ 0,2 ^a	6,74 $\pm$ 0,4 ^a	6,26 $\pm$ 0,2 ^a
T24	6,76 $\pm$ 0,6 ^a	7,86 $\pm$ 0,4 ^a	6,46 $\pm$ 0,5 ^a	7,08 $\pm$ 0,7 ^a	3,68 $\pm$ 1,0 ^a	5,30 $\pm$ 0,2 ^a	7,10 $\pm$ 0,3 ^a	7,82 $\pm$ 0,7 ^a
T48	6,00 $\pm$ 0,5 ^a	5,76 $\pm$ 0,5 ^a	6,70 $\pm$ 0,2 ^a	5,34 $\pm$ 0,3 ^b	2,80 $\pm$ 1,2 ^a	4,58 $\pm$ 0,3 ^a	6,93 $\pm$ 0,1 ^a	5,80 $\pm$ 0,6 ^a
T72	5,20 $\pm$ 0,6 ^a	5,00 $\pm$ 0,5 ^a	4,38 $\pm$ 1,3 ^a	5,68 $\pm$ 0,7 ^a	1,88 $\pm$ 1,3 ^a	4,58 $\pm$ 0,5 ^a	6,10 $\pm$ 0,4 ^a	5,64 $\pm$ 0,2 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F ($P<0,05$)

4.2.7 FREQUÊNCIA DE BATIMENTOS FLAGELARES (BCF)

Não houve nenhuma interação nesta característica. Houve efeito isolado de tempo ($P=0,0003$) e de tratamento ($P=0,0387$), sendo que os valores médios da BCF foram maiores no S, exceto no T72 (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da frequência de batimentos flagelares (BCF) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

4.2.8 RETILINEARIDADE (STR)

Não houve nenhuma interação nesta característica. Somente houve efeito de tratamento ($P=0,0003$), sendo que os valores médios da STR foram maiores no C, como pode ser visualizado no gráfico seguinte (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da retilinearidade (STR) dos espermatozóides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

4.2.9 LINEARIDADE (LIN)

Não houve interações nesta característica. Houve efeito isolado de tempo ($P=0,0022$) e de tratamento ($P=0,0213$), sendo que os valores da LIN foram maiores no C (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da linearidade (LIN) dos espermatozoides equinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

4.3 ANÁLISE DA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Nesta análise não houve nenhuma interação e somente o efeito de garanhão foi significativo ($P<0,0001$). Os valores médios dos defeitos em cada garanhão podem ser visualizados na tabela 11.

Tabela 11 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem de defeitos dos espermatozoides de cada garanhão - Pirassununga - 2007

Defeitos (%)	Garanhão			
	G1	G2	G3	G4
Maiores	6,6 $\pm$ 0,4 ^d	39,5 $\pm$ 1,3 ^b	49,6 $\pm$ 1,8 ^a	18,2 $\pm$ 1,7 ^c
Menores	2,1 $\pm$ 0,2 ^c	2,5 $\pm$ 0,2 ^c	5,4 $\pm$ 0,3 ^a	3,6 $\pm$ 0,2 ^b
Total	8,7 $\pm$ 0,4 ^d	42,0 $\pm$ 1,4 ^b	55,0 $\pm$ 1,8 ^a	21,8 $\pm$ 1,8 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P<0,05$)

Apesar de não ter havido efeito significativo de tratamento no total de defeitos ($P=0,1467$), foi observado que os valores médios foram superiores no C. Além disso, os

defeitos também tiveram uma pequena variação no tempo, apesar do mesmo não ser significativo ($P=0,6373$), como pode ser visualizado no gráfico 10.

Gráfico 10 - Valores das médias $\pm$ erro padrão dos defeitos totais dos espermatozoides equinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Ao analisar a média de defeitos menores e maiores separadamente, foi verificado que nos defeitos maiores os valores do C foram superiores e que nos defeitos menores os valores do S foram ligeiramente mais elevados. A partir disso, foi comparado cada defeito separadamente, dentro de cada garanhão, em ambos os tratamentos. Os defeitos que tiveram diferença entre os tratamentos foram: gota protoplasmática proximal, no G3; formas teratológicas, no G1 e G2; cauda fortemente dobrada ou enrolada, no G2; cabeça gigante, curta, larga ou pequena normal, no G3; e gota protoplasmática distal, no G3. Todos os defeitos citados foram maiores no C e o garanhão que teve a maior diferença entre os tratamentos no total de defeitos foi o G3 (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Valores das médias $\pm$ erro padrão da porcentagem de dos defeitos totais dos espermatozoides refrigerados do garanhão G3, nos dois tratamentos, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Ainda, foi comparado cada defeito nos diferentes tempos em cada garanhão. Os defeitos que tiveram diferença entre os tempos foram: gota protoplasmática proximal, no G1 (T0=1,0%; T24=0,6%; T48=0,5%; T72=0,2%) e G3(T0=4,5%; T24=1,7%; T48=2,0%; T72=1,3%); e cabeça isolada normal, no G1 (T0=0,1%; T24=0,3%; T48=0,5%; T72=0,4%). Houve uma tendência da porcentagem de gota protoplasmática proximal diminuir com o tempo e a porcentagem de cabeça isolada normal aumentar.

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

Foram emitidos gráficos e uma tabela de porcentagens para cada análise no citômetro de fluxo, de onde foram extraídos os resultados. Para a análise estatística da integridade de membranas foram selecionadas as porcentagens das células com membrana plasmática intacta e acrossomo intacto (PIAI-quadrante inferior esquerdo), a somatória de membrana plasmática lesada (PL-quadrantes superiores), e a somatória de membrana acrossomal lesada (AL-quadrantes da direita) (Figura 5).

Figura 5 - Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise da integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides equinos refrigerados

Para a análise estatística do potencial de membrana mitocondrial, foi selecionado somente o alto potencial (APM-quadrante superior esquerdo) (Figura 6).

Figura 6 - Exemplos de gráfico de densidade e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides eqüinos refrigerados

4.4.1 MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL INTACTAS (PIAI)

Houve interação tempo e tratamento ($P < 0,0001$). Os valores médios de PIAI foram maiores no C, sendo que só não foi encontrada diferença significativa no T0 ($P > 0,05$) (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Valores das médias $\pm$ erro padrão das membranas plasmática e acrossomal intactas (PIAI) dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Também houve interação entre tempo e gananhão ($P < 0,0001$). As médias de espermatozoides PIAI de cada gananhão, nos diferentes tempos, estão na tabela 12.

Tabela 12 - Médias $\pm$ erros padrão de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas em cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão			
	G1	G2	G3	G4
T0	60,5 $\pm$ 2,1 ^{abA}	64,8 $\pm$ 2,2 ^{aA}	55,7 $\pm$ 1,5 ^{bA}	60,0 $\pm$ 3,0 ^{abA}
T24	59,3 $\pm$ 2,0 ^{aA}	56,0 $\pm$ 4,0 ^{aA}	40,0 $\pm$ 4,2 ^{bAB}	57,9 $\pm$ 1,9 ^{aA}
T48	53,8 $\pm$ 2,1 ^{aA}	51,7 $\pm$ 4,4 ^{aA}	37,1 $\pm$ 5,0 ^{bB}	53,0 $\pm$ 2,9 ^{aA}
T72	21,7 $\pm$ 4,8 ^{aB}	15,3 $\pm$ 4,2 ^{aB}	22,0 $\pm$ 4,5 ^{aC}	28,6 $\pm$ 3,8 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Houve efeito significativo do garanhão (P=0,0002). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 13.

Tabela 13 - Médias $\pm$ erro padrão das membranas plasmática e acrossomal intactas (PIAI; %) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	56,05 $\pm$ 2,6 ^b	64,10 $\pm$ 2,1 ^a	63,86 $\pm$ 1,6 ^a	65,8 $\pm$ 4,3 ^a	54,22 $\pm$ 2,8 ^a	57,12 $\pm$ 1,4 ^a	54,38 $\pm$ 4,7 ^a	65,72 $\pm$ 1,8 ^a
T24	58,82 $\pm$ 2,1 ^a	59,82 $\pm$ 3,7 ^a	50,30 $\pm$ 6,7 ^a	61,62 $\pm$ 3,5 ^a	30,88 $\pm$ 5,3 ^b	49,04 $\pm$ 3,0 ^a	55,44 $\pm$ 2,2 ^a	60,40 $\pm$ 2,9 ^a
T48	54,16 $\pm$ 3,4 ^a	53,38 $\pm$ 2,8 ^a	43,68 $\pm$ 7,1 ^a	59,68 $\pm$ 1,8 ^a	24,16 $\pm$ 4,8 ^b	50,06 $\pm$ 2,1 ^a	47,5 $\pm$ 4,2 ^b	58,56 $\pm$ 2,2 ^a
T72	12,82 $\pm$ 6,2 ^b	30,52 $\pm$ 5,0 ^a	3,12 $\pm$ 0,8 ^b	27,44 $\pm$ 2,4 ^a	9,74 $\pm$ 2,1 ^b	34,34 $\pm$ 2,5 ^a	18,46 $\pm$ 2,9 ^b	38,70 $\pm$ 2,3 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F (P<0,05)

4.4.2 MEMBRANA PLASMÁTICA LESADA (PL)

Houve interação tempo e tratamento (P<0,0001) e tempo e garanhão (P<0,0001). Os valores médios de PL foram significativamente maiores no S em todos os tempos (P<0,05) (Gráfico 13).

Gráfico 13 - Valores das médias $\pm$ erro padrão de membrana plasmática lesada (PL) dos espermatozoides equinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Além disso, houve interação de tempo e garanhão ($P < 0,0001$). As médias de espermatozoides PL de cada garanhão, nos diferentes tempos, estão na tabela 14.

Tabela 14 - Médias $\pm$ erros padrão de espermatozoides com membrana plasmática lesada em cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão			
	G1	G2	G3	G4
T0	34,2 $\pm$ 2,1 ^{abA}	28,8 $\pm$ 2,2 ^{bA}	38,3 $\pm$ 1,3 ^{aA}	33,1 $\pm$ 3,5 ^{abA}
T24	35,3 $\pm$ 1,7 ^{bB}	37,8 $\pm$ 3,9 ^{bB}	52,5 $\pm$ 4,2 ^{aB}	34,3 $\pm$ 1,6 ^{bB}
T48	40,4 $\pm$ 1,9 ^{bB}	42,0 $\pm$ 4,5 ^{abB}	55,7 $\pm$ 5,2 ^{aBC}	39,2 $\pm$ 2,7 ^{bB}
T72	74,9 $\pm$ 5,1 ^{aB}	79,2 $\pm$ 5,1 ^{aB}	73,2 $\pm$ 4,5 ^{aC}	65,6 $\pm$ 4,0 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

Houve efeito significativo do garanhão ($P = 0,0008$). As médias de cada animal, em ambos os tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 15.

Tabela 15 - Médias $\pm$ erro padrão das membranas plasmática lesadas (PL; %) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	39,68 $\pm 2,0^a$	28,72 $\pm 1,3^b$	30,74 $\pm 2,0^a$	26,90 $\pm 4,1^a$	39,70 $\pm 2,2^a$	36,96 $\pm 1,4^a$	38,86 $\pm 5,8^a$	27,28 $\pm 2,4^a$
T24	36,44 $\pm 1,9^a$	34,16 $\pm 3,0^a$	44,24 $\pm 6,5^a$	31,34 $\pm 2,5^b$	62,00 $\pm 5,6^a$	42,98 $\pm 2,0^b$	37,64 $\pm 1,7^a$	30,92 $\pm 1,9^b$
T48	40,60 $\pm 2,9^a$	40,18 $\pm 2,9^a$	50,94 $\pm 6,9^a$	33,00 $\pm 2,1^b$	69,10 $\pm 1,8^a$	42,40 $\pm 5,3^b$	45,04 $\pm 3,4^a$	33,36 $\pm 2,7^b$
T72	83,98 $\pm 6,7^a$	65,90 $\pm 5,5^a$	93,86 $\pm 1,2^a$	64,54 $\pm 2,9^b$	85,64 $\pm 2,9^a$	60,74 $\pm 2,7^b$	76,64 $\pm 2,3^a$	54,64 $\pm 2,3^b$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F ($P < 0,05$)

4.4.3 MEMBRANA ACROSSOMAL LESADA (AL)

Houve interação tempo e tratamento ($P < 0,0001$). Os valores médios de AL foram significativamente maiores no S em todos os tempos ($P < 0,05$) (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Valores das médias $\pm$ erro padrão de acrossomo lesado (AL) dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Ainda, houve efeito significativo do garanhão ($P = 0,0132$). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 16.

Tabela 16 - Médias $\pm$ erro padrão de membrana acrossomal lesada (AL; %) dos espermatozoides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	50,52 $\pm 10,2^a$	27,84 $\pm 2,6^a$	28,94 $\pm 2,6^a$	25,00 $\pm 3,2^a$	40,42 $\pm 3,5^a$	32,08 $\pm 1,2^a$	26,72 $\pm 4,9^a$	19,9 $\pm 3,3^a$
T24	35,06 $\pm 3,7^a$	28,32 $\pm 5,7^a$	44,86 $\pm 7,5^a$	25,04 $\pm 4,5^b$	66,66 $\pm 5,6^a$	38,66 $\pm 4,4^b$	32,94 $\pm 7,0^a$	29,3 $\pm 3,8^a$
T48	43,03 $\pm 3,6^a$	34,76 $\pm 2,6^a$	49,02 $\pm 8,9^a$	28,18 $\pm 1,9^a$	72,68 $\pm 5,2^a$	38,32 $\pm 2,3^b$	44,06 $\pm 4,9^a$	29,42 $\pm 1,2^a$
T72	78,38 $\pm 13,2^a$	43,44 $\pm 9,3^b$	77,04 $\pm 19,0^a$	37,62 $\pm 2,0^a$	87,58 $\pm 3,2^a$	35,20 $\pm 1,3^b$	70,80 $\pm 4,6^a$	35,42 $\pm 6,2^b$

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F ($P < 0,05$)

4.4.4 ALTO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (APM)

Houve interação tempo e tratamento ($P < 0,0001$). Os valores médios de APM foram significativamente maiores no C em todos os tempos ($P < 0,05$) (Gráfico 15).

Gráfico 15 - Valores das médias $\pm$ erro padrão de alto potencial de membrana mitocondrial (APM) dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Além disso, houve interação de tempo e garanhão ($P < 0,0001$). As médias de espermatozoides APM de cada garanhão, nos diferentes tempos, estão na tabela 17.

Tabela 17 - Médias $\pm$ erros padrão dos espermatozóides com alto potencial de membrana mitocondrial em cada garanhão, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempos	Garanhão			
	G1	G2	G3	G4
T0	65,8 $\pm$ 2,3 ^{aA}	68,9 $\pm$ 1,4 ^{aA}	62,1 $\pm$ 1,8 ^{aA}	66,3 $\pm$ 3,4 ^{aA}
T24	70,1 $\pm$ 2,0 ^{aA}	65,4 $\pm$ 4,1 ^{aA}	51,9 $\pm$ 4,1 ^{bAB}	67,0 $\pm$ 1,7 ^{aA}
T48	68,0 $\pm$ 2,9 ^{aA}	62,1 $\pm$ 5,1 ^{abA}	45,8 $\pm$ 5,7 ^{bBC}	64,0 $\pm$ 2,3 ^{aA}
T72	33,8 $\pm$ 6,0 ^{aB}	28,7 $\pm$ 5,8 ^{aB}	33,0 $\pm$ 3,8 ^{aC}	38,0 $\pm$ 4,6 ^{aB}

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste Tukey (P<0,05).

Houve efeito significativo do garanhão (P=0,0002). As médias de cada animal, em ambos tratamentos, nos diferentes tempos, estão na tabela 18.

Tabela 18 - Médias $\pm$ erro padrão de alto potencial de membrana mitocondrial (APM; %) dos espermatozóides de cada garanhão, sem (S) ou com (C) centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Tempo (h)	Garanhão							
	G1		G2		G3		G4	
	S	C	S	C	S	C	S	C
T0	59,72 $\pm$ 1,8 ^b	71,94 $\pm$ 1,6 ^a	67,18 $\pm$ 1,3 ^a	70,68 $\pm$ 2,4 ^a	59,26 $\pm$ 3,0 ^a	65,04 $\pm$ 1,6 ^a	58,50 $\pm$ 4,0 ^b	74,12 $\pm$ 2,4 ^a
T24	65,48 $\pm$ 1,7 ^b	74,72 $\pm$ 2,0 ^a	56,86 $\pm$ 5,6 ^b	74,02 $\pm$ 2,7 ^a	41,68 $\pm$ 4,4 ^b	62,06 $\pm$ 1,8 ^a	64,60 $\pm$ 2,4 ^a	69,48 $\pm$ 1,8 ^a
T48	61,26 $\pm$ 2,7 ^b	74,82 $\pm$ 2,8 ^a	51,24 $\pm$ 6,5 ^b	72,92 $\pm$ 4,1 ^a	32,24 $\pm$ 3,9 ^b	59,34 $\pm$ 6,2 ^a	57,76 $\pm$ 2,2 ^b	70,24 $\pm$ 0,7 ^a
T72	22,30 $\pm$ 7,2 ^b	45,22 $\pm$ 6,8 ^a	12,26 $\pm$ 2,9 ^b	45,12 $\pm$ 3,0 ^a	23,18 $\pm$ 1,7 ^b	42,88 $\pm$ 3,9 ^a	25,40 $\pm$ 2,9 ^b	50,66 $\pm$ 2,7 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha e no mesmo garanhão indicam diferença significativa pelo teste F (P<0,05)

4.5 ANÁLISE DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DA MEMBRANA ESPERMÁTICA

A seguir encontra-se um exemplo do gráfico e tabela de porcentagens emitidos para cada análise no citômetro de fluxo (Figura 7). Para a análise estatística foram descontadas a porcentagem de células não coradas ou debris (situados no quadrante inferior esquerdo -

azul), e somente as células com a membrana peroxidada (Perox - quadrante superior esquerdo) foram selecionadas.

Figura 7 - Exemplos de gráfico de pontos e tabela de porcentagens originados pelo citômetro de fluxo na análise de peroxidação lipídica da membrana espermática dos espermatozoides eqüinos refrigerados

Não houve efeito de interação e o único efeito isolado significativo foi o de tempo ($P=0,0080$), sendo que houve um aumento da peroxidação até o T24 e depois um declínio, como pode ser visualizado no gráfico seguinte (Gráfico 16).

Gráfico 16 - Valores das médias $\pm$ erro padrão de peroxidação da membrana dos espermatozoides eqüinos refrigerados, submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

Apesar de não ter havido efeito do garanhão, a seguir estão os gráficos da peroxidação lipídica da membrana de cada garanhão, somente para observação da variação encontrada no garanhão G1 (Gráfico 17).

Gráfico 17 - Valores das médias $\pm$ erro padrão de peroxidação da membrana dos espermatozoides refrigerados de cada garanhão (G1, G2, G3 e G4), submetidos ou não à centrifugação, nos diferentes tempos - Pirassununga - 2007

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O sêmen refrigerado de alguns garanhões apresenta uma longevidade baixa, este fato pode ser resultante de alterações ocorridas durante o armazenamento na forma refrigerada, fazendo com que o sêmen se torne inviável para a inseminação artificial. Assim, avaliar detalhadamente os efeitos causados por estas alterações, pode ser útil para elucidar alguns problemas do sêmen refrigerado, aumentando assim o sucesso da IA.

Neste experimento observou-se que as motilidades total e progressiva tiveram melhor manutenção no sêmen centrifugado ($P < 0,05$). Como era esperado, houve um decréscimo das motilidades durante a armazenagem, sendo este mais acentuado a partir de 48h, provavelmente causado pela perda da capacidade de refrigeração e manutenção da temperatura interna em aproximadamente 5°C no dispositivo utilizado, fato observado em todas as análises de 72h.

Jasko et al. (1991) também obtiveram motilidade espermática maior no sêmen equino submetido à centrifugação (500g/18min) e refrigerado por 24h, quando o plasma seminal foi retirado e os espermatozóides diluídos em diluidor de leite desnatado. Os autores ainda relatam que quando o plasma seminal foi mantido após a centrifugação, houve uma redução imediata da motilidade, mas este efeito não foi mantido após a refrigeração do sêmen. Este fato também foi notado neste experimento na maioria dos garanhões, quanto à motilidade total, sugerindo que a centrifugação não causa danos na motilidade espermática no sêmen refrigerado e que a diminuição da quantidade de plasma seminal a favorece.

Macedo (2005) também relata acontecimento similar, porém as amostras centrifugadas só obtiveram valores maiores a partir de 48h a 5°C . Esta pequena diferença com o resultado apresentado pode ser explicada pela maior força de centrifugação (600g/10min).

Serres et al. (2002), analisando sêmen de jumentos, obtiveram resultados bem parecidos com os deste experimento utilizando uma força de centrifugação mais aproximada à utilizada (400g/7min). Houve superioridade da motilidade total e progressiva dos espermatozóides centrifugados ($P < 0,01$) durante a refrigeração por até 96h, sendo o tempo significativo ($P < 0,0001$) e a interação tempo e tratamento não significativo ($P > 0,05$).

A maioria do plasma seminal foi retirada juntamente com o diluidor, no sobrenadante, após a centrifugação, permanecendo apenas uma quantidade mínima junto ao sedimento. Apesar de não ter sido estipulada a concentração de plasma residual, estudos indicam que

quanto menor a concentração do plasma, melhor a manutenção da motilidade no sêmen refrigerado (JASKO et al., 1992; KELLER et al., 2001; TODD et al., 2001; SCHIMITT et al., 2003). Isto condiz com os resultados obtidos neste experimento, no qual o sêmen com menor quantidade de plasma, preservou melhor a motilidade.

Estudos utilizando diluidor a base de leite suplementado com sais também relatam superioridade da motilidade dos espermatozóides centrifugados, com retirada do plasma seminal, diluídos e então refrigerados entre 4 a 5°C por até 72h (PADILLA; FOOTE, 1991; WEBB; ARNS, 1995; RIGBY et al., 2001).

Em outro estudo, o sêmen de garanhões que apresentavam baixa motilidade depois da refrigeração, teve uma melhora quando o plasma seminal foi retirado pela centrifugação antes da refrigeração (BRINSKO; CROCKETT; SQUIRES, 2000). O mesmo ocorreu neste experimento com os dois garanhões, G2 e G3, que apresentavam uma grande redução da motilidade após 24h de armazenamento, e esta foi menos acentuada no sêmen centrifugado. Isto sugere que existe um componente no plasma seminal de garanhões que reduz a motilidade espermática durante a refrigeração, porém a extensão de seus efeitos varia entre os garanhões.

É possível também fazer um paralelo com estudos de sêmen fracionado (VARNER, 1987; KARESKOSKI et al., 2005, 2006). Estes indicam que a fração rica em espermatozóide, na qual a quantidade de plasma seminal é limitada, preserva melhor a motilidade. Além disso, Kareskoski et al. (2005) sugerem que alta concentração de cloro e sódio na primeira fração pode ser deletéria para a manutenção da motilidade durante a refrigeração. Assim, quando não é realizada a colheita fracionada, esta fração é mantida no sêmen, o que pode explicar a menor motilidade do sêmen sem centrifugação.

No presente experimento, a centrifugação causou efeito negativo nas velocidades espermáticas, cujos valores foram superiores no sêmen sem centrifugação em todos os tempos, sendo que para VAP e VCL as diferenças foram significativas no T0, T24 e T48, enquanto que para a VSL só foi encontrada diferença no T48 ($P < 0,05$). Como não há um padrão de velocidade estipulada para o sêmen equino e também há variação entre os ajustes do aparelho, fica difícil comparar os valores com outros experimentos. Mas é compreensível o comportamento semelhante da VAP e VCL, uma vez que a VCL é a velocidade do deslocamento real do espermatozóide e a VAP é a velocidade curvilínea do espermatozóide sobre um trajeto uniforme, desconsiderando seu deslocamento lateral.

Estes resultados discordam em parte com os encontrados por Pagl et al. (2006), que compararam a centrifugação (600g/10min) do sêmen eqüino, em diluidor a base de proteínas de leite (EquiPro[®]), mantido no refrigerador por até 72h. Os autores relataram que durante a refrigeração o sêmen centrifugado apresentou maior motilidade espermática ($P<0,05$) e que a centrifugação não interfere negativamente nas velocidades espermáticas. Provavelmente esta diferença com os resultados aqui apresentados seja devido ao diluidor utilizado; o diluidor a base de leite deve ter uma viscosidade maior do que o diluidor somente a base de proteínas do leite; assim no sêmen centrifugado, que tinha mais diluidor, houve uma interferência maior.

Ainda, no presente experimento foram obtidos valores menores na BCF no sêmen centrifugado ($P<0,05$), exceto no T72 ($33,94 \pm 1,07$ x $33,05 \pm 3,39$; C e S respectivamente). Isto ocorreu devido ao espermatozóide do C apresentar menor VAP e VCL, visto que a BCF é determinada pela medida da frequência que a cabeça do espermatozóide atravessa a trajetória. Como no T72 as velocidades nos tratamentos foram semelhantes, a BCF também foi similar.

A retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) obtiveram maiores valores no C ($P<0,05$) em todos os tempos. A STR é obtida pela divisão entre VSL/VAP, ou seja, é uma comparação da linha reta com a média do caminho do espermatozóide. Entretanto, a LIN é obtida pela divisão entre VSL/VCL, ou seja, é uma comparação da linha reta com o caminho curvilíneo do espermatozóide. Como todas as velocidades foram menores no C, ao serem divididas e multiplicadas por 100, visto que a STR e LIN são expressas em porcentagem, geraram valores maiores do que no S. O alto valor de STR indica que a trajetória dos espermatozóides no C foi mais uniforme e com baixa amplitude, enquanto que a alta LIN no C indica uma baixa amplitude do caminho curvilíneo e direção parecida com o caminho em linha reta. Assim, percebe-se que o movimento dos espermatozóides no S era mais circular que no C.

O ALH foi a única característica do movimento no qual o tratamento não surtiu efeito. No sêmen sem centrifugação o ALH apresentou valores decrescentes no decorrer do tempo, com uma queda mais acentuada no T72. Já, no centrifugado houve uma oscilação dos valores, que aumentou após 24h de refrigeração, sendo que neste tempo a diferença foi significativa entre os tratamentos ($7,02 \pm 0,34$ x $6,0 \pm 0,44$ μ m; C e S respectivamente), então houve uma queda no T48 ($5,37 \pm 0,23$ μ m) e praticamente se manteve no T72 ($5,23 \pm 0,26$ μ m). Esta diferença no T24 indica que os espermatozóides do C apresentavam um movimento menos linear que os do S, que pode ter sido causado por algum efeito da centrifugação ou pelo maior aporte de Ca^{2+} e açúcares do diluidor, que pode ter iniciado a hiperativação espermática.

Durante a hiperativação, o padrão do vigor espermático passa por mudanças dramáticas, caracterizadas por um grande aumento da amplitude do deslocamento lateral da cabeça e cauda do espermatozóide, acompanhado por uma motilidade baixa ou pouco progressiva, uma frequência baixa de batimento flagelar, mas bem curvilínea, e um movimento circular não progressivo do espermatozóide. Assim, valores altos de VCL e ALH e baixos de LIN podem ser critérios para distinguir o movimento do espermatozóide hiperativado (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002).

Ao analisar estes critérios neste experimento, observou-se uma variação entre os tratamentos. Os valores médios obtidos para VCL foram maiores no S e decrescentes com o tempo (222,3, 203,0, 190,0 e 129,1 $\mu\text{m/s}$; respectivamente T0, T24, T48 e T72). Quanto ao ALH o valor mais alto foi do C no T24 (7,02 μm). Por fim, a média da LIN se manteve entre 36,55 a 40,35% no C e 33,9 a 42,4 no S, sendo que os menores valores foram encontrados no T48 para o C e no T72 para o S.

Em um estudo com espermatozóides eqüinos capacitados *in vitro*, Rathi et al. (2001) estabeleceram que os espermatozóides hiperativados eram aqueles que apresentavam ALH $>12\mu\text{m}$ e VCL $>180\mu\text{m/s}$, porém o ajuste (*setup*) do CASA foi diferente do utilizado neste experimento. Além disso, salientam que a hiperativação pode ocorrer em espermatozóides incubados com meios suplementados com bicarbonato de sódio e Ca^{2+} . Ambas as substâncias, também encontradas no plasma seminal, podem estar presentes em diluidores a base de leite. Porém, provavelmente o diluidor utilizado neste experimento, como a maior parte dos diluidores comerciais, não contém bicarbonato.

Esta idéia é reforçada com o estudo de Pommer, Linfor e Meyers (2002) sobre o efeito dos diluidores comerciais durante a incubação de espermatozóides. Os autores relatam uma maior VCL e menor STR e LIN em espermatozóides diluídos em um diluidor a base de leite (EZ-Mixin[®]), relacionando estes valores a uma possível capacitação espermática.

Neste sentido, parece que parte das células espermáticas submetidas à refrigeração passa por um estado de hiperativação, podendo culminar com a capacitação. No entanto, como é sabido, de forma geral, o sêmen refrigerado, por até 24h, tem índices de fertilidade semelhantes ou levemente inferiores ao da monta natural ou IA com sêmen a fresco.

Uma outra análise importante é a morfologia espermática. Várias pesquisas demonstraram que o aumento de espermatozóides anormais no ejaculado está diretamente correlacionado com a diminuição da fertilidade (GRAHAM, 1996).

Ao analisar as médias de defeitos maiores de cada garanhão utilizados neste experimento, sem considerar o tratamento realizado no sêmen, verificou-se que o G2 e G3 apresentaram médias superiores, sendo que os defeitos predominantes em ambos foram os problemas de peça intermediária e cauda fortemente dobrada. Provavelmente essa alta quantidade de defeitos está associada à idade, avançada no G2 (17 anos) e reduzida no G3 (4 anos), também podendo ser inata neste último.

Vale salientar que estes dois garanhões foram os que apresentaram os menores valores quanto às características de movimento espermático, sendo estes bastante afetados durante a refrigeração e os menos longevos. Almeida (2004) relata acontecimento semelhante e alerta para a importância de alterações de cauda e peça intermediária na capacidade dos espermatozóides se manterem móveis de forma progressiva durante a refrigeração, e ainda, que os percentuais de tais defeitos podem ser críticos na longevidade do sêmen.

A centrifugação não teve efeito significativo sobre as alterações morfológicas ($P>0,05$). Porém foi observada uma tendência de maiores porcentagens do total de defeitos no sêmen centrifugado. Por esta análise ser subjetiva, é passiva a erros de técnica, e esta diferença pode ter sido ao acaso. O aumento de gotas protoplasmáticas possivelmente foi ocasionado pelo desprendimento parcial, durante a centrifugação, do excesso citoplasmático na peça intermediária, presente em grande porcentagem dos espermatozóides no garanhão G3, deixando apenas resquícios no começo ou final da peça intermediária, sendo estes interpretados como gotas. Este excesso citoplasmático também ocorreu bastante nos espermatozóides do garanhão G2 e muitas vezes era acompanhado de forte dobramento de cauda, o que pode explicar o seu aumento após centrifugação, com o desprendimento do excesso citoplasmático o dobramento foi evidenciado.

Sieme, Knop e Rath (2006) relataram que a centrifugação causou efeitos deletérios na motilidade e morfologia do espermatozóide, porém foi utilizada uma força de centrifugação e tempo maiores (1000g/20min) do que a do presente experimento.

Apesar de que o tempo também não teve efeito significativo ($P>0,05$), observou-se uma diminuição de gota protoplasmática no decorrer do tempo, sendo possível que tenha havido um desprendimento destas gotas durante o armazenamento. O aumento da porcentagem de cabeça isolada normal pode ter sido ocasionado no manuseio da amostra.

A avaliação compartimentada da membrana plasmática e da mitocôndria é muito importante, uma vez que a integridade das membranas é essencial para a manutenção da viabilidade, enquanto que a atividade mitocondrial é necessária para gerar energia para o

batimento flagelar, hiperativação e penetração do espermatozóide no oócito. (PAPAIOANNOU et al., 1997).

No presente trabalho observou-se que a centrifugação foi benéfica para a manutenção da integridade da membrana plasmática e acrossomal e do alto potencial de membrana mitocondrial, visto que o C obteve valores maiores ($P < 0,05$) para PIAI (exceto no T0) e APM, e menores para PL e AL em todos os tempos.

Os resultados apresentados também estão de acordo com os encontrados por outros estudos, nos quais a remoção do plasma seminal por centrifugação resultou em valores maiores de integridade de membrana espermática no sêmen refrigerado (SERRES et al., 2002; CARVALHO, 2003; FOGAL et al., 2006; PAGL et al., 2006).

Contudo, Macedo (2005) relata que não houve diferença significativa entre amostras de sêmen com diferentes diluidores, submetidas ou não a centrifugação, exceto para um diluidor, constituído de glicose, frutose, citrato, glicina, taurina, ringer lactato, leite desnatado e amicacina, que apresentou valores superiores ($P < 0,05$) para as amostras centrifugadas. O diluidor utilizado no presente experimento pode ter composição semelhante, visto que sua formulação foi estabelecida após estudos com diversos diluidores, inclusive este citado acima.

Como esperado, houve um decréscimo da integridade das membranas dos espermatozoides de ambos tratamentos no decorrer do tempo ($P < 0,05$), sendo mais acentuado a partir de 48h.

De acordo com Almeida (2004), a longevidade seminal aparentemente está relacionada com o nível de alterações morfológicas e integridade de membrana dos espermatozoides. Em seu experimento com sêmen equino refrigerado a 5°C por até 72h, também obteve diferenças significativas ($P < 0,05$) para a porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas em todos os tempos.

Love et al. (2003) relataram um decréscimo significativo da motilidade, analisada por sistema computadorizado, e da viabilidade, analisada por citometria de fluxo, do sêmen refrigerado entre o tempo 0 e 24h. Além disso, obtiveram alta correlação entre a motilidade total e a viabilidade espermática, analisada com SYBR-14/IP/JC-1. Apesar de não terem sido calculadas as correlações no presente experimento, percebe-se um comportamento semelhante entre MT, PIAI e APM.

Bosard et al. (2005) avaliaram o acrossomo dos espermatozoides, utilizando FITC-PSA na citometria de fluxo, em amostras de sêmen a fresco (tempo 0) e após refrigeração por 24h. Os autores constataram um decréscimo da porcentagem de espermatozoides com

acrossomo intacto ($P < 0,001$) quando o sêmen foi refrigerado, sendo aproximadamente 6% menor. Este resultado é compatível com o apresentado no sêmen centrifugado, porém o decréscimo de espermatozóides com acrossomo intacto no sêmen sem centrifugação foi bem mais elevado; isto pode ter ocorrido devido à interação do plasma seminal com os componentes do diluidor utilizado. Além disso, nos diluidores a base de leite há glicose e uma alta concentração de Ca^{2+} , ambos presentes em meios capacitantes, assim, podendo mimetizar a condição associada à capacitação espermática, uma vez que há uma grande disponibilidade de cálcio para entrar na célula. Estas condições podem causar capacitação prematura e peroxidação lipídica nos espermatozóides durante o armazenamento e transporte, principalmente por longos períodos (POMMER; LINFOR; MEYERS, 2002; MCNIVEN; RICHARDSON, 2006).

A peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide não sofreu efeito do tratamento ($P > 0,05$), mas houve uma tendência de menor porcentagem de espermatozóides com membrana peroxidada no sêmen centrifugado. Isto sugere que a remoção parcial do plasma seminal não interfere tanto na capacidade antioxidante do sêmen refrigerado, visto que o espermatozóide também possui sistemas antioxidantes, em menor proporção, mas que podem controlar a peroxidação lipídica. Segundo Ball et al. (2000) o principal sistema antioxidante é do sêmen é a catalase (CAT). Apesar da centrifugação remover uma porção substancial de CAT, existe ainda sua atividade na membrana espermática, que não é removida com a centrifugação. Ainda, a atividade endógena da CAT varia bastante entre os garanhões. Isto pode explicar a variação da resistência à peroxidação encontrada neste experimento. Provavelmente a capacidade antioxidante dos espermatozóides do garanhão G1 seja mais elevada, pois sua peroxidação foi mais baixa. Já a capacidade antioxidante dos espermatozóides do G4 deve ser inferior, visto que após 24h o sêmen sem centrifugação obteve uma peroxidação menor.

A capacidade de geração de EROs é aumentada nos espermatozóides com alterações na morfologia, principalmente a retenção citoplasmática, como as gotas, e também na presença de leucócitos, principalmente os neutrófilos. O total de defeitos do garanhão G1 foi bem inferior ao dos outros animais. Os garanhões G2 e G3 apresentavam uma maior retenção citoplasmática do que o G4, porém a porcentagem de peroxidação deste último foi um pouco maior. No entanto, outras alterações já foram relacionadas com a alta produção de EROs, como cabeças anormais, defeitos de acrossoma, peça intermediária, cauda e DNA (GUERRA;

EVANS; MAXWELL, 2004). Nenhum garanhão apresentava indícios de inflamação no trato reprodutor, o que poderia levar a presença de leucócitos e um aumento de EROs no sêmen.

A peroxidação lipídica é controlada pelos antioxidantes presentes no sêmen, que previnem a formação excessiva de peróxidos. No entanto, a capacidade antioxidante endógena do sêmen pode ser insuficiente durante seu armazenamento (AURICH et al., 1997).

Foi observado efeito do tempo ($P<0,05$) com um aumento acentuado da peroxidação no T24, seguido de um declínio equivalente no T48 e então uma pequena queda no T72. Possivelmente a alta peroxidação encontrada após 24h foi devido ao maior metabolismo celular nas primeiras horas de refrigeração, que levou a uma maior produção de EROs. Então com a queda da temperatura e consequentemente do metabolismo, a peroxidação foi menor após 48h. Mesmo com o leve aumento da temperatura no T72, a peroxidação foi ainda menor, sendo provavelmente combatida em maior parte pelos sistemas antioxidantes do próprio espermatozóide, visto que a diminuição do plasma seminal não causou um aumento da peroxidação.

No entanto, Kankofer et al. (2005) não relataram aumento da peroxidação lipídica no sêmen eqüino refrigerado a 5°C por 24h, sendo a análise realizada pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), utilizado como um indicador da peroxidação lipídica. Vale salientar que alguns componentes dos diluidores de sêmen também são TBARS, assim, ao utilizar esta técnica para determinação da peroxidação lipídica no sêmen diluído, a reação não ocorrerá somente com o malondeído (STRADAIOLI; MAGISTRINI, 2002). A técnica utilizada neste experimento é mais confiável, pois a sonda utilizada incorpora-se à membrana, detectando a peroxidação de forma direta.

Utilizando a mesma sonda deste experimento para destacar a peroxidação, Ball e Vo (2002) observaram um pequeno aumento da peroxidação no sêmen eqüino refrigerado por 48h a 5°C. Porém, em um estudo mais recente, utilizando a mesma técnica, Almeida e Ball (2005) não encontraram aumento significativo da peroxidação.

É importante ressaltar que o estresse oxidativo, determinado pela produção excessiva de EROs, além da capacidade antioxidante do sêmen, causa disfunções na célula espermática através de diferentes mecanismos, não só a peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, mas também inibição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004).

No estudo de Baumber et al. (2000) foi detectada uma diminuição da motilidade total, VSL, VCL, VAP, ALH e LIN ($P<0,01$) dos espermatozóides induzidos à produção de EROs.

Porém, não foi encontrada diferença significativa quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal e no potencial de membrana mitocondrial. Já a peroxidação lipídica, aumentou significativamente somente quando a indução foi máxima. Isto sugere que a motilidade pode ser afetada pelas EROs por uma ação independente da peroxidação lipídica e das disfunções mitocondriais. Os resultados do presente experimento corroboram estes achados, pois o garanhão que teve o menor valor da motilidade inicial foi o G3, e este apresentou peroxidação lipídica ligeiramente inferior ao do G4, que ao final das 72h foi o que apresentou a maior motilidade. O mesmo se aplica quanto ao potencial de membrana mitocondrial e também à integridade de membranas.

Segundo Aurich (2005), a peroxidação lipídica leve aparentemente só promove a capacitação espermática, enquanto que a peroxidação excessiva danifica a membrana plasmática e resulta na perda da motilidade e fertilidade.

Isto leva a crer que no presente experimento a peroxidação ocorrida foi leve e pode ter iniciado capacitação no sêmen centrifugado, apesar dos resultados não terem sido evidentes, mas pode ter sido causada pela falta de agentes que atuam na prevenção de capacitação espermática prematura, presentes no plasma seminal, como uma glicoproteína chamada de fator antifertilidade, que bloqueia capacitação. Não está claro se esta proteína tem propriedades antioxidante ou potencial para inibir os sistemas produtores de EROs (MCNIVEN; RICHARDSON, 2006).

Ainda, a peroxidação encontrada no sêmen refrigerado não foi suficiente para lesionar as membranas, visto que sua integridade não decaiu excessivamente nas primeiras 24h de refrigeração, o que indica que a membrana pode ter sido afetada por outros fatores presentes no plasma seminal.

Sabe-se que o plasma seminal possui uma complexa composição, sendo que esta pode influenciar na qualidade espermática, de forma positiva ou negativa. Embora se pense que a após centrifugação é possível retirar totalmente o plasma seminal, é bem plausível que uma pequena fração permaneça no sedimento. Após a centrifugação utilizada neste experimento, foi mantida uma pequena quantidade de plasma seminal junto ao sedimento e, por mais que seja possível perceber que os espermatozóides do sedimento estão em íntimo contato, deve existir ainda uma pequena quantidade de plasma seminal entre os espermatozóides. Isso implica que esta quantidade seria o bastante para manter os efeitos benéficos e amenizar a influência negativa do plasma seminal durante a refrigeração do sêmen. Porém, ressalta-se a

importância que o diluidor tem no sêmen centrifugado, uma vez que neste há uma maior quantidade de diluidor, assim sua escolha correta é imprescindível para o sucesso da técnica.

A partir dos resultados apresentados percebe-se que a qualidade do sêmen submetido à centrifugação foi superior, principalmente nos garanhões com menor longevidade. Corroborando os resultados de outros estudos, isto evidencia que a utilização da centrifugação é vantajosa para aqueles garanhões cujo sêmen não responde bem ao processo de refrigeração.

Além das características analisadas, pode-se pressupor que melhoria do sêmen centrifugado é devido a uma seleção espermática, visto que os espermatozóides mortos ficam aderidos no fundo do sedimento. Ainda, sugere que a maioria dos componentes deletérios do plasma seminal pode ter um maior peso molecular, assim também ficam retidos no fundo do sedimento, ou um menor peso, ficando suspenso no sobrenadante que foi retirado. Estudos mais detalhados sobre os efeitos dos diferentes componentes do plasma seminal poderão contribuir para uma melhor manutenção da qualidade do sêmen refrigerado.

6 CONCLUSÕES

- A centrifugação do sêmen e retirada do plasma seminal melhora a qualidade do sêmen refrigerado.
- Garanhões com baixa longevidade do sêmen refrigerado são beneficiados quando é realizada a centrifugação do sêmen previamente à refrigeração, garantindo melhor manutenção da viabilidade do sêmen.
- Existem fatores no plasma seminal que interferem na motilidade espermática e integridade das membranas, sendo a susceptibilidade aos efeitos variada entre os garanhões.
- A longevidade do sêmen refrigerado é influenciada pelas características iniciais da morfologia espermática, sendo que altas porcentagens de alterações afetam a preservação do sêmen refrigerado.
- O aumento do tempo de refrigeração induz a um declínio das características de movimento espermático e das porcentagens de espermatozóides com membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial, porém não interfere nas alterações morfológicas.
- Existe aumento da peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide nas primeiras 24h de refrigeração, tanto no sêmen centrifugado como no sem centrifugação.
- A peroxidação lipídica da membrana do espermatozóide parece não ser a principal causa de alterações da integridade das membranas e do potencial de membrana mitocondrial durante a refrigeração.

Referências

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.
- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.
- AITKEN, R. J. Founders'lecture - Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 655-664, 2004.
- ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**: uma introdução à biologia molecular da célula. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294 p.
- ALMEIDA, H. B. **Concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona, triiodotironina e tiroxina e a longevidade de sêmen equino resfriado**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 334-346, 1995.
- AMANN, R. P. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. **Theriogenology**, v. 63, p. 698-715, 2005.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. 1. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 80, p. 715-745.
- ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; 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. 42, p. 190-194, 2007.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide 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, São Paulo, 2000.

- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 230-231, 2003. Suplement.
- ARRUDA, R. P.; FORERO – GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F. Efeitos da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial do espermatozóide bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 329, 2005. Suplement.
- AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, p. 791-797, 1996.
- AURICH, J. E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.
- BALL, B. A. Evaluation and use of transported equine semen. In: EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, 1998, Davis. **Proceedings...** Davis, 1998. p. 18-24.
- BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I. K. M. Catalase activity in equine semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 1026-1030, 2000.
- BALL, B. A.; VO, A.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508-515, 2001.
- BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 259-269, 2002.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FALQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1997.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J. M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.
- BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, p. 235-247, 1983.

- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction And Development**, v. 73, p. 1338–1344, 2006.
- BOSARD, T.; LOVE, C.; BRINSKO, S.; BLANCHARD, T.; THOMPSON, J.; VARNER, D. Evaluation and diagnosis of acrosome function/dysfunction in the stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 215-217, 2005.
- BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. **Veterinary Clinics of North America**, v.8, p. 205-218, 1992.
- BRINSKO, S. P.; CROCKETT, E. C.; SQUIRES, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.
- BRINSKO, S. P.; ROWAN, K. R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1641-1655, 2000.
- BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; DAY, B. C.; WILSON, M. E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1519-1527, 2005.
- BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.
- BROUWERS, J. F. H. M.; SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze–thawing. **Theriogenology**, v. 63, p. 458–469, 2005.
- 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.
- CARVALHO, G. A. **Efeito de diferentes diluentes sobre viabilidade espermática, utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino**. 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.
- CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBINS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15 , 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004. p. 511.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment

of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, 2007 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2006.00810.x). Disponível em <<http://www.blackwell-synergy.com/loi/RDA>>. Acesso em: 20 maio 2007.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

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

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; ZAHN, F. S. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 324-325, 2001.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291-304, 1984.

DRUMMEN, G. P.; GADELLA, B. M.; POST, J. A.; BROUWERS, J. F. Mass spectrometric characterization of the oxidation of the fluorescent lipid peroxidation reporter molecule C11-BODIPY(581/591). **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 1635-1644, 2004.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994. p.29-77.

FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FOGAL, C. L.; KOZINK, D. M.; PINTO, C. R.; DOUGLAS, R. H. Effect of centrifugation on equine semen quality over time during cool storage incubation. **Theriogenology**, v. 66, p. 675-676, 2006.

GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-06, 1997.

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

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GOULART, H. M.; SILVA, A. E. D. F.; MCMANUS, C.; PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 112-122, 2004.

GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-47, 1996.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.
- GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.
- GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v. 15, p. 5-10, 2001.
- GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.
- JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, p. 1059-1067, 1991.
- JASKO, D. J.; HATHWAY, J. A.; 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.
- JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, p. 156-170, 1994.
- 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°C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.
- KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Composition of fractionated stallion ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 228-230, 2005.
- KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 33-38, 2006.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.
- KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 267-272, 2001.
- KAYSER, J. P.; AMANN, R. P.; SHIDELER, E. L.; JASKO, D. J.; PICKETT, B. W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 601-614, 1992.

- KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HÖTT, A.; VIEIRA, M.J.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 318-319, 2001.
- KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Lexington. **Proceedings...** Lexington, 1975, p. 327-336.
- LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P.; BATELLIER, F.; BERNELAS, D.; BONNE, J. L.; FORGERIT, Y.; RENAUD, G.; MAGISTRINI, M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 867-877, 2003.
- LIPAR, J. L.; KETTERSON, E. D.; NOLAN, V. J. R.; CASTO, J. M. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **Genetic Compendium of Endocrinology**, v. 115, p. 220-227, 1999.
- LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p. 663-676, 2006.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 47, 2001, San Diego. **Proceedings...** San Diego, 2001. v. 47, p. 229-231.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; BLANCHARD, T. L.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques by flow cytometry. **Theriogenology**, v. 60, p. 1127-1138, 2003.
- 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, p. 1584-1591, 2005.
- MACEDO, L. P. **Efeito de diferentes diluentes e antibióticos sobre a longevidade e fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2005.
- MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.
- MATTOS, R. C.; SCHMITT, F. L.; OBERST, E. R.; JOBIM, M. I. M. Influência do plasma seminal de garanhões da baixa e alta qualidade espermática na motilidade, integridade e funcionalidade de membrana plasmática de espermatozoides resfriados a +4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 336-338, 2003.
- MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Effect of quercetin on capacitation status and lipid peroxidation of stallion spermatozoa. **Cell Preservation Technology**, v. 4, p. 169-177, 2006.

- METCALF, E. S. Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. In: American Associations Equine Practitioners, 44, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore, 1998. p. 16-18.
- MINELLI, A. L.; MORONI, M.; MARTINEZ, E.; MEZZASOMA, I.; RONQUIST, G. Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 237–243, 1998.
- MOLECULAR PROBES INCORPORATION. **Product information:** Bodipy®-Lipid probes. MP 03792. Eugene: Molecular Probes, Inc. 2003, 4 p.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, p. 2372-2381, 2005a.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, p. 241–249, 2005b.
- 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.
- NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluorescência) espermatozóides eqüinos criopreservados.** Pirassununga, 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, 2006.
- NEILD, D. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230–238, 2005.
- 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, J. E.; MULLER-SCHLOSSER, 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.
- PAP, E. H.; DRUMMEN, G. P.; WINTER, V. J.; KOOIJ, T. W. A.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W. A.; OP DEN KAMP, J. A. F.; HAGE, W. J.; POST, J. A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY^{581/591}. **FEBS Letters**, v. 453, p. 278-282, 1999.
- PAPAIIOANNOU, K. Z.; MURPHY R. P.; MONKS, R. S.; HYNES, N.; RYAN, M. P.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 46, p. 299-312, 1997.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, Nova York, v. 38, p. 209-222, 1992.

- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.
- PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. L. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 19-27, 2005. Supplement.
- POMMER, A. C.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v. 57, p. 1493-1501, 2002.
- PROVINCE, C. A.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 23, p. 925-934, 1985.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M.. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 462-470, 2001.
- REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potencial. **Biochemistry**, v. 30, p. 4480-4486, 1991.
- 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.
- RITAR, A.J.; SALOMON, S. Effect of centrifugation and seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Australian Journal of Biology Science**, v. 35, p.305-312, 1982.
- SCHMITT, F. L.; JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; MALSCHITZKY, E.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. A concentração do plasma seminal e o diluente afetam as características espermáticas do sêmen equino resfriado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 334-336, 2003.
- SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A. L.; SANTIAGO, I.; GABRIEL, J.; GOMES-CUETARA, C.; MATEOS, E. Effect of centrifugation and temperature on motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leones donkey sêmen. . **Theriogenology**, v. 58, p. 329-332, 2002.
- SIEME, H.; KNOP, K.; RATH, D. Effects of cushioned centrifugation on sperm quality in stallion semen stored cooled at 5°C for 24 h, and stored cooled for 2 or 24 h and then frozen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 99-103, 2006.
- SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; FONSECA, F. A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. **Caderno Técnico da Escola Veterinária**. UFMG, Belo Horizonte, n. 11, p. 3-112, 1994.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

- SOUZA, N. L. **Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados equinos**. Pirassununga, 2001. 76 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and Frozen Stallion Semen. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Fort Collins, Bulletin*, n. 9, p. 1-38, 1999.
- STRADAIOLI, G.; MAGISTRINI, M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for determination of malondialdehyde in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 58, p. 347–350, 2002.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. **SAS User's Guide: statistics**. Version 8.2. Cary: SAS Institute Inc., 2001.
- THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998.
- TODD, P.; ARNS, M. J.; CHENOWETH, P.; SCHULTZ, B. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 28, p. 335–336, 2001.
- 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.; BUHL, W. C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 171–186, 2005.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; PALHARES, M. S.; MELO, M. A.; MAGNAGO, L. G. P. Utilização de um container modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 505-514, 1999.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 28, p. 709-723, 1987.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 29, p. 1043-1053, 1988.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J.; MEYERS, S. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology*, v. 32, p. 515-525, 1989.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.
- VIANNA, S. A. B.; SOUZA, G. V.; FAGUNDES, B.; FONSECA, C. W.; MAEDA, M.; GUIMARÃES, M. C.; MATTA, M. F. R.; MATTA, C. G. F.; TILBURG, M. F.; SILVA, J. F.

S. A influência do plasma seminal na congelabilidade de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 179-181, 2003.

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. 4, p. 907-919, 2000.

WEBB, G. W.; ARNS, M. J. Influence of modified Tyrode's media on motility of cold-stored stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 15, p. 441-445, 1995.

WEBB, G.; HUMES, R. A comparison of the ability of three commercially available diluents to maintain the motility of cold-stored stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 135-137, 2006.

Anexos

ANEXO A - AJUSTE DO IVOS-12.3 PARA ANÁLISE DE SÊMEN EQUINO

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas (<i>Image capture:frames</i>)	30
Taxa de aquisição das imagens (<i>Image capture:frames per sec</i>)	60 Hz
Contraste mínimo da célula (<i>Cell detection:minimum contrast</i>)	80
Tamanho mínimo da célula (<i>Cell detection:minimum size</i>)	5 pixels
Tamanho para células imóveis (<i>Defaults:cell size</i>)	7 pixels
Intensidade para células imóveis (<i>Defaults:cell intensity</i>)	60
Referência de VAP para células progressivas (<i>Progressive cells: VAP</i>)	30,0 µm/s
Referência de STR para células progressivas (<i>Progressive cells:STR</i>)	70%
Referência de VAP para células lentas (<i>Slow cells: VAP cut-off</i>)	30,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas (<i>Slow cells: VSL cut-off</i>)	20,0 µm/s
Limite superior de tamanho da célula (<i>Qc plots: Static size gates-Max</i>)	2,48 pixels
Limite inferior de tamanho da célula (<i>Qc plots: Static size gates-Min</i>)	0,29 pixels
Limite superior de intensidade da célula (<i>Qc plots: Static intensity gates-Max</i>)	1,51
Limite inferior de intensidade da célula (<i>Qc plots: Static intensity gates-Min</i>)	0,46
Limite superior de alongamento da célula (<i>Qc plots: Cell elongation-Max</i>)	98%
Limite inferior de alongamento da célula (<i>Qc plots: Cell elongation-Min</i>)	0%
Aumento (<i>Optics: Magnification</i>)	1,89
Temperatura (<i>Stage:Set stage temperature</i>)	37° C

ANEXO B - TALP SPERM**1. SOLUÇÃO DE SAIS DO TALP (para preparar 500mL)****Componentes:**

-
- NaCl 2,1 g
- KCl 0,935 g
- NaHCO₃ 1,05 g
- NaH₂PO₄ 0,025 g
- CaCl 2H₂O 0,145 g
- MgCl 6H₂O 0,04 g
- Hepes 3,25 g

Preparo:

- Diluir CaCl 2H₂O e MgCl 6H₂O em 200 mL de água destilada
- Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- Filtrar
- Manter resfriado

2. SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS**- SOLUÇÃO ESTOQUE (para preparar 50 mL)****Componentes:**

- Glicose 2.5 g
- Lactato de Sódio 9.25 mL
- Piruvato de Sódio 70 mg
- Pen-Strep 12.5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL)
- Manter em freezer (-20° C)

- SOLUÇÃO TRABALHO

Preparo:

- Colocar 45 mL da Solução de Sais do TALP
- Ajustar o pH para 7,4
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Filtrar em filtro de 0,45 µm
- Aliquotar (alíquotas de 300 µL)
- Manter em freezer (-20° C)

3. TALP SPERM (preparo no dia)

Componentes:

- 10 mL da Solução de Sais do TALP
- 200 µL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados
- 100 mg de soro albumina bovina (BSA)

Preparo:

- Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4
- Filtrar em filtro de 0,45 µm

ANEXO C - DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

1. IODETO DE PROPÍDIO (PI, Sigma-Aldrich, 28,707-5 - 25 mg)

- **SOLUÇÃO ESTOQUE**(25 mg/mL)

25 mg de PI + 1 mL de DMSO

- **SOLUÇÃO TRABALHO** (0,5 mg/mL)

20 µL da solução estoque de IP + 980 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

2. FITC-PSA (FITC-PSA, Sigma, L-0770 – 2 mg)

- **SOLUÇÃO TRABALHO** (100 µg/mL)

2 mg de FITC-PSA + 20 mL de DPBS + 10% de solução de azida de sódio 10%

Aliquotar e Armazenar a 4° C, no escuro

3. JC-1 (Molecular Probes, T-3168 – 5 mg)

- **SOLUÇÃO ESTOQUE** (DMSO) - 1,53 mM

- **SOLUÇÃO TRABALHO** (DMSO) - 153 µM

Armazenar em freezer, no escuro.

. C11-BODIPY⁵⁸¹⁻⁵⁹¹ (C11-BD, Molecular Probes, D-3861 – 1 mg)

- **SOLUÇÃO TRABALHO** (1 mg/mL)

1 mg de C11-BD + 1 mL de DMSO

Aliquotar (5µL, retirar o ar)

Armazenar em freezer, no escuro.