

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**TAMPÕES EM DILUENTES PARA RESFRIAMENTO DE SÊMEN
EQUINO**

Autora: Janislene Mach Trentin

**PORTO ALEGRE
2014**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

TAMPÕES EM DILUENTES PARA RESFRIAMENTO DE SÊMEN
EQUINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin

PORTO ALEGRE

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Trentin, Janislene Mach
Tampões em diluentes para resfriamento de sêmen
equino / Janislene Mach Trentin. -- 2014.
65 f.

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. armazenamento. 2. bicarbonato de sódio. 3.
espermatozoides. 4. HEPES. I. Rubin, Mara Iolanda
Batistella, orient. II. Título.

JANISLENE MACH TRENTIN

**TAMPÕES EM DILUENTES PARA RESFRIAMENTO DE SÊMEN
EQUINO**

APROVADA POR:

Prof^ª. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dra. Adriana Pires Neves
Membro da comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Membro da comissão

Prof. Dr. Lucio Pereira Rauber
Membro da comissão

AGRADECIMENTOS

À Professora e orientadora Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade, pelos ensinamentos, suporte, incentivo e amizade durante todos esses anos.

Aos meus pais e minha irmã pelo apoio incondicional.

Ao Professor Dr. Carlos Antonio Mondino Silva pelas sugestões e colaboração.

Aos meus colegas de Pós-graduação Murilo Farias Rodrigues, Gilson Antonio Pessoa e Ana Paula Martini por terem contribuído no meu aprendizado profissional.

Aos estagiários do EMBRYOLAB - UFSM pela amizade e colaboração fundamental na realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. Flávio De La Corte e à Professora Dra. Karin Érica Brass pelos ensinamentos transmitidos.

Ao Professor Dr. Luis Felipe Dias Lopes pela realização das análises estatísticas.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos pela oportunidade e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Tampões em diluentes para resfriamento de sêmen equino

Dissertação de Mestrado

Autora: Janislene Mach Trentin

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

RESUMO

Nesse estudo comparou-se o efeito tamponante do HEPES e Bicarbonato de Sódio em manter o pH e a viabilidade do sêmen resfriado de pôneis da raça Brasileira. As alterações no pH ocasionadas por diferentes diluições com diluente a base de leite desnatado em pó sem tampão a 5 e a 15°C também foram medidas. No experimento 1 avaliou-se o efeito da diluição e da temperatura de resfriamento sobre a motilidade, integridade de membrana, pH e atividade mitocondrial do sêmen pré e pós resfriamento. O sêmen de nove pôneis da raça Brasileira (dois ejaculados/pônei) foi diluído em diluente a base de leite desnatado (em pó) sem tampão e refrigerado a 5 ou 15°C por 48h em três diferentes diluições (1+1, 1+2, 1+3). As três diluições não alteraram os parâmetros avaliados após a diluição a fresco. A diluição 1+1 resultou em valores maiores de pH (7,63 e 7,57, respectivamente) e menor percentual de motilidade progressiva (MP) a 5 e a 15°C. O maior percentual de células íntegras (1+1=44,16; 1+2=48,16; 1+3=50,05) foi detectado a 15°C ($P < 0,01$), independente da diluição. A MP foi maior nas 48h de resfriamento (39,72%; $P < 0,05$) quando o sêmen foi diluído a 1+3 e refrigerado a 15°C. A atividade mitocondrial ($P > 0,05$) em função do tempo e temperatura foi similar entre as diluições. No experimento 2 avaliou-se o efeito tampão do bicarbonato de sódio e do HEPES em diluentes sobre a viabilidade de espermatozoides resfriados a 5°C durante 48h. Os diluentes testados compunham-se de leite desnatado em pó com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou diluente sem tampão (C). O sêmen de sete pôneis da raça Brasileira (três ejaculados/pônei) foi utilizado e a motilidade progressiva foi similar entre os diluentes ($P > 0,05$) após a diluição. Nas 24 e 48h, a MP foi, respectivamente, para A (44,76%; 25,23%), B (51,42%; 38,09%) e C (54,05%; 41,66%). A integridade da membrana plasmática foi similar após a exposição aos três diluentes. A fresco, a atividade mitocondrial foi maior ($P < 0,05$) no sêmen exposto ao diluente A (A=1,05nm, B=0,81nm, C=0,79nm) e após 24h A e B foram similares (0,83nm; 0,73nm), enquanto que no diluente C observou-se menor atividade (0,64nm). Nas 48h não houve diferença (A=0,72; B=0,69; C=0,63; $P > 0,05$). O pH do diluente e sua osmolaridade, assim como o pH do sêmen diluído foi maior no diluente A (8; 382; 7,9), intermediário (7,5; 362; 7,32) no B e menor no C (7,16; 350; 7,07). A peroxidação lipídica e a indução da peroxidação foram similares em todos os grupos. Sugere-se que, quando da utilização do sêmen a fresco, qualquer das diluições aqui testadas pode ser utilizada com segurança. O resfriamento do sêmen por 48h modifica e eleva o pH do sêmen. Os melhores resultados foram observados com o resfriamento do sêmen a 15°C por 48h e com a diluição 1+3 em um diluente a base de leite em pó desnatado sem tampão. O bicarbonato de sódio (A) reduz a MP e aumenta o pH do sêmen. O diluente sem tampão foi considerado o mais apropriado para uso imediato na IA. Tanto o diluente com HEPES, quanto o diluente sem tampão foram adequados para o resfriamento do sêmen equino a 5°C durante 48h.

Palavras-chave: espermatozoide, bicarbonato de sódio, HEPES, armazenamento

Buffers in extenders for cooling equine semen

*Master of Science Dissertation
Author: Janislene Mach Trentin
Adviser: Mara Iolanda Batistella Rubin*

ABSTRACT

This study compared the buffering effect of HEPES and sodium bicarbonate on pH and viability of Brazilian pony semen cooled at 5°C. pH changes caused by different dilutions using skim milk powder semen extender without buffer were also measured. In experiment 1, the effect of dilution and cooling temperature on semen motility, membrane integrity, mitochondrial activity and pH pre and post cooling was investigated. Ejaculates of nine Brazilian ponies (two ejaculates per pony) were diluted, of a non buffered powder milk extender and cooled at 5°C or 15°C during 48h in three different dilutions (1+1, 1+2 and 1+3). Dilutions did not change the parameters evaluated before cooling. Samples diluted 1+1 resulted in higher pH values (7.63 and 7.57, respectively) and lowest percentage of progressive motility (PM) at 5 and 15°C. All samples cooled at 15°C showed a lower incidence of abnormal spermatozoa (1+1 = 55.84%; 1+2 = 51.84%; 1+3 = 49.95%) ($P < 0.01$) independent of dilution. Progressive motility was higher when semen was cooled during 48h in 1+3 dilution at 15°C (39.72%; $P < 0.05$). Mitochondrial activity despite of time and temperature was similar ($P > 0.05$) among dilutions. In experiment 2, the buffer effect of sodium bicarbonate and HEPES on extenders were evaluated considering the maintenance of sperm viability after cooling at 5°C during 24 and 48h. A non-buffered milk powder extender (C = control) and the same extender buffered with Sodium Bicarbonate (A) and HEPES (B) was used. Semen from 7 Brazilian ponies (three ejaculates / pony) was used. Immediately after dilution sperm motility was evaluated and progressive motility was similar with all extenders ($P > 0.05$). At 24 and 48h after cooling at 5°C sperm motility was evaluated, respectively, on groups A (44.76%; 25.23%), B (51.42%; 38.09%) and C (54.05%; 41.66%). Plasma membrane integrity was similar after exposure to the three extenders. Before cooling, mitochondrial activity was higher ($P < 0.05$) in extender A (A = 1.05nm, B = 0.81nm, C = 0.79nm). Mitochondrial activity after cooling for 24h was 0.83nm (A), 0.73nm (B) and 0.64nm (C). After 48h it decreased to 0.72nm (A), 0.69nm (B) and 0.63nm (C) ($P > 0.05$), respectively. The extenders pH, osmolarity and pH of diluted semen was higher in A (8; 382; 7.9), intermediate in B (7.5; 362; 7.32) and lower in C (7.16; 350; 7.07). Lipid peroxidation and its induction were similar in all groups. It was concluded that all dilution grades in fresh semen were adequate and that pH was affected and increased when semen was extended and cooled for 48h. The best results were observed when semen was diluted at 1+3 and cooled at 15°C for 48h in a non buffered powder milk extender. Sodium bicarbonate (A) reduces progressive motility and increases semen pH. The non buffered (C) semen extender was considered more appropriated for semen dilution for immediate use in artificial insemination. The non buffered and HEPES buffered semen extenders were considered appropriated for cooling equine semen at 5°C during 48h.

Keywords: *sperm, sodium bicarbonate, HEPES, cooling*

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- FIGURA 1** Motilidade progressiva de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira em diluente a base de leite em pó desnatado em três diferentes diluições (1+1, 1+2, 1+3) e resfriados a 5°C e 15°C ($P < 0.001$)..... **35**
- FIGURA 2** Percentual de espermatozoides reagentes ao teste hiposmótico a fresco e após 24h e 48h de resfriamento do sêmen de pôneis da raça Brasileira a 5°C ou 15°C em três diferentes diluições ($P < 0.001$)..... **36**
- FIGURA 3** Absorbância da atividade mitocondrial dos espermatozoides de pôneis da raça Brasileira resfriados a 5°C, 15°C e a fresco diluídos em três diferentes diluições ($P = 0.049$)..... **36**
- FIGURA 4** Valores de pH do sêmen de pôneis da raça Brasileira diluído em três diferentes diluições a fresco e após 24h e 48h de resfriamento a 5 e 15°C ($P < 0.0001$)..... **37**

Capítulo 2

- FIGURA 1** Médias da motilidade espermática progressiva do sêmen de pôneis da raça Brasileira resfriado a 5°C por 48h em diluentes com bicarbonato de sódio (A), B (HEPES) ou sem tampão (C) ($P = 0.0278$)..... **49**
- FIGURA 2** Médias do percentual de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira reagentes ao Teste Hiposmótico, resfriados a 5°C em diluentes com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), por 48h ($P > 0.05$)..... **50**
- FIGURA 3** Valores de absorbância da atividade mitocondrial do sêmen de pôneis da raça Brasileira nos diluentes com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), resfriados por 48h a 5°C ($P = 0.002$)..... **51**
- FIGURA 4** Valores de absorbância de diluentes para sêmen equino com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) e sem tampão (C). **51**
- FIGURA 5** Valores de pH do sêmen diluído de pôneis da raça Brasileira em diluente com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), a fresco e refrigerado a 5°C por 48h ($P = 0.0278$)..... **52**

- FIGURA 6** Valores médios do pH dos diluentes A, B e C para sêmen equino a fresco (0h) e nas 24h e 48h de resfriamento ($P = 0.0278$)..... **52**
- FIGURA 7** Valores médios de osmolaridade dos diluentes com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), a fresco (0h) e refrigerados a 5°C por 48h ($P = 0.002$)..... **53**

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1	Médias e desvios-padrões da motilidade progressiva, teste hiposmótico, atividade mitocondrial e pH de sêmen de pôneis da raça Brasileira submetido a três diferentes diluições a fresco e resfriado a 5°C e 15°C por 48h.....	34
-----------------	---	-----------

TABELA 2	Médias e desvios padrões da motilidade progressiva, teste hiposmótico, atividade mitocondrial e pH em três diluições, avaliados a fresco, 24h e 48h após resfriamento do sêmen de pôneis da raça Brasileira a 5 e 15°C.....	35
-----------------	---	-----------

Capítulo 2:

TABELA 1	Composição química de soluções diluentes com distintos tampões testadas em sêmen de pôneis da raça Brasileira.....	46
-----------------	--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Íon cálcio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramas
h	Horas
HOST	Teste hiposmótico
IA	Inseminação artificial
%	Porcentagem
pH	Potencial de Hidrogênio
P	Nível de significância
Mm	Milimolar
mOsM	Miliosmóis
MP	Motilidade progressiva
MTT	Atividade mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Sêmen.....	13
2.2	Espermatozoide e membrana plasmática.....	13
2.3	Diluentes para sêmen equino.....	14
2.4	Diluentes a base de leite.....	16
	2.4.1 Tampões.....	16
	2.4.2 Antibióticos.....	18
2.5	pH.....	18
2.6	Osmolaridade.....	19
2.7	Plasma seminal.	20
2.8	Diluição do sêmen.....	21
2.9	Ação do frio sobre a célula espermática.....	21
2.10	Resfriamento do sêmen: curvas de resfriamento e sistemas de resfriamento.....	22
2.11	Variação individual.....	23
2.12	Peroxidação lipídica dos espermatozoides.....	24
2.13	Técnicas de avaliação do sêmen.....	26
	2.13.1 Motilidade espermática.....	26
	2.13.2 Funcionalidade de membrana – Teste hiposmótico.....	27
	2.13.3 Atividade mitocondrial através da redução do Tetrazolium (MTT).....	28
	2.13.4 Peroxidação lipídica detectada através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	28
3	CAPÍTULO 1.....	30
4	CAPÍTULO 2.....	43
5	COMITÊ DE ÉTICA.....	57
6	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia de resfriamento de sêmen teve grande impacto sobre a indústria da reprodução equina, especialmente ao longo dos últimos anos, com a aceitação do uso de sêmen resfriado pela maioria das raças equinas (LOOMIS, 2006). A taxa de fertilidade do sêmen refrigerado pode ser alterada por fatores incluindo diferenças inerentes não só pela variação individual entre garanhões, mas também como a metodologia de processamento e refrigeração do sêmen, além do diluente de sêmen utilizado (AURICH, 2008, NUNES et al., 2008).

Em 1975, a formulação de um diluente a base de leite desnatado e glicose foi publicado por Kenney e colaboradores. Este diluente se tornou popular e impulsionou o uso da inseminação artificial. A busca por novos diluentes ou modificações nos diluentes existentes no mercado nacional para promover melhores resultados é constante. Novos diluentes para resfriamento de sêmen equino foram desenvolvidos para melhorar o meio para os espermatozoides e a sua longevidade (AURICH, 2008). A evolução do uso do sêmen resfriado gerou o desenvolvimento de novos diluentes que atuam garantindo maior tempo de armazenamento, mantendo assim a capacidade fecundante o maior tempo possível com redução de problemas como a qualidade do sêmen (COCCHIA et al., 2011).

O uso de diluente adequado é essencial para a proteção do espermatozoide equino durante seu armazenamento (BATELLIER et al., 1997). Sabe-se que os diluentes prolongam a vida dos espermatozoides, estabilizando os sistemas enzimáticos e mantêm a integridade da membrana. Além disso, protegem o espermatozoide de condições ambientais desfavoráveis, como choque térmico, dos efeitos prejudiciais do plasma seminal e de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, prevenindo o crescimento de microrganismos, aumentando o volume a ser inseminado e melhorando a motilidade espermática (PICKETT & AMANN, 1987). Os diluentes também são utilizados para aumentar a viabilidade do sêmen de garanhões subfêrteis (BLANCHARD et al., 1987). Resfriando-se o sêmen é possível diminuir o estresse causado pelo transporte, bem como os riscos com acidentes e aquisição de doenças resultantes da exposição a agentes patogênicos de um novo ambiente (BRINSKO & VARNER, 1992).

Os diluentes devem ter pH e pressão osmótica similares aos do sêmen (PICKETT & AMANN, 1987). Como a osmolaridade do fluido seminal é de aproximadamente 300 mOsmol/kg (PICKETT et al., 1976), a osmolaridade do diluente deve variar entre 300 e 400 mOsmol/kg, considerando-se ideal 350 mOsmol/kg (VARNER et al., 1991). O pH deve variar entre 6,7 e 7,2 sem interferir na viabilidade espermática durante o armazenamento (BRINSKO & VARNER, 1992).

Os fatores externos às células espermáticas, tais como alterações na composição, pH, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas limitando a função fertilizante dos espermatozoides (WATSON, 2000). O contínuo metabolismo espermático produz grandes quantidades de catabólitos tóxicos, acarretando aumento do ácido láctico no meio extracelular. Este acúmulo pode causar a morte dos espermatozoides devido a drásticas alterações do pH no meio extracelular, justificando a necessidade de adição de tampões ao diluente (HOLT, 2000).

Neste estudo comparou-se a ação de dois componentes químicos com ação tamponante, o Bicarbonato de Sódio e o HEPES, adicionados ao diluente composto por leite desnatado (em pó) e glicose sobre o pH e viabilidade do sêmen de pôneis da raça Brasileira resfriado por 48h a 5°C. O efeito de três diluições (1+1, 1+2 e 1+3) do sêmen também foi avaliado em diluente a base de leite em pó desnatado sem tampão sobre o pH e viabilidade do sêmen refrigerado a 5 e 15°C.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sêmen

O uso de sêmen equino resfriado ocorre em nível mundial sendo enviado, inclusive por via aérea, para regiões muito distantes. O envio de sêmen reduz os gastos, evita o transporte de éguas até o local onde se encontra o garanhão de escolha e amplia consideravelmente o número de garanhões disponíveis para os proprietários das éguas (COCCHIA et al., 2011).

O sêmen é composto por uma população heterogênea de espermatozoides viáveis e não viáveis suspenso nas secreções de várias glândulas sexuais acessórias. Adicionalmente, também pode conter outras células como por exemplo os leucócitos, células epiteliais, eritrócitos, células germinativas imaturas, além de contaminantes tais como bactérias, vírus e urina (LOOMIS, 2006).

O garanhão ejacula em uma série de cinco a oito jatos ou frações e a composição de cada fração é variável. As primeiras secreções não contêm espermatozoides e originam-se principalmente das glândulas bulbouretrais. Os próximos dois ou três jatos contêm a maioria dos espermatozoides (frações ricas em espermatozoides) e as frações finais contêm poucos espermatozoides e são compostas principalmente por secreções das vesículas seminais (MANN et al., 1963; KATILA et al., 2002). O ejaculado ideal para ser utilizado no resfriamento é aquele que contém baixo volume, alta concentração espermática e alto número de espermatozoides com motilidade progressiva (AURICH, 2011).

2.2 Espermatozoide e membrana plasmática

Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e especializadas em armazenamento e transporte de material genético (AURICH, 2005). O espermatozoide consiste em cinco áreas específicas: o acrossoma, segmento equatorial, basal, a peça intermediária e cauda (LADHA, 1998).

Como o espermatozoide maduro perde a maioria de suas organelas celulares e a transcrição do DNA cessou, a síntese de proteínas e os mecanismos de reparo não estão

disponíveis, danos a membrana plasmática dos espermatozoides resultam em perda irreversível de suas funções (EDDY & O'BRIEN, 1994). As alterações na membrana também induzem alterações de acrossoma o que causa redução da longevidade e capacidade de fertilização espermática quando inseminados (MARSHBURN et al., 1992). As alterações fisiológicas da membrana plasmática após a ejaculação são relacionadas à capacitação, ou seja, a aquisição da capacidade fecundante e isso resulta em padrão diferente de motilidade denominada de hipermotilidade (YANAGIMACHI, 1994).

A membrana plasmática de espermatozoides equinos possui teor relativamente elevado de colesterol, que é de aproximadamente 37%. No entanto, o teor de colesterol não só difere entre espécies, mas também entre machos dentro de uma espécie e entre ejaculados de um único garanhão (GADELLA et al., 2001).

2.3 Diluentes para sêmen equino

Os diluentes de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozoides de condições desfavoráveis e prolongar sua sobrevivência durante o resfriamento e transporte, além de aumentar o volume da dose inseminante e auxiliarem na análise do sêmen (PICKETT & SHINER, 1994; DARENIUS, 1998).

Uma variedade de diluentes com a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes, antibióticos, etc.) tem sido desenvolvida para melhorar a qualidade de sêmen equino resfriado, mantendo a qualidade do movimento e a integridade das membranas espermáticas, melhorando com isso a fertilidade (PAGL et al., 2006). Um diluente adequado tampona alterações de pH do sêmen, mantém a osmolaridade da amostra, proporciona fontes de energia e de proteína para o metabolismo dos espermatozoides, estabiliza a membrana durante mudanças na temperatura, reduz os efeitos prejudiciais do plasma seminal, proporciona propriedades antibacterianas por meio dos antibióticos (AURICH et al., 2007) e mantém a integridade da cromatina (LOVE et al., 2002).

Os componentes dos diluentes desempenham um papel importante na sobrevivência dos espermatozoides em baixas temperaturas mantendo o meio e, direta ou indiretamente, afetando a membrana espermática (CRESPILHO et al., 2013). Os

diluentes de sêmen são preparados principalmente com leite ou gema do ovo de galinha. Os diluentes com composição semelhante à original, publicada por Kenney et al. (1975) são os mais populares e utilizados mundialmente. Estes diluentes são de baixo custo, fáceis de preparar, podem ser armazenados sob a forma congelada e resultam em taxas de fertilidade aceitáveis. Os diluentes para sêmen equino comercializados no Brasil são EZ – Mixin® (CST), Max Sêmen® (Agrofarma), Botu-Sêmen® e Botu-Turbo® (Biotech Botucatu), Equimix® (Nutricell), sendo que todos utilizam leite e ou derivados em sua composição (RAPHAEL, 2007).

A glicose e sacarose ou a combinação de ambas foram os primeiros açúcares utilizados em diluentes de sêmen. Produtos metabolizáveis como frutose, lactose, rafinose, sacarose, piruvato e, mais comumente, glicose fornecem substratos adequados para a produção de ATP pelos espermatozoides (KATILA, 1997).

Os diluentes constituídos de gema de ovo produzem resultados semelhantes aos diluentes a base de leite, mas são mais complexos para processar e geralmente não resultam em qualidade do sêmen ou fertilidade aumentada (MALMGREN et al., 1994). Phillips & Lardy (1940) demonstraram que a gema do ovo preveniu o dano causado pelo choque térmico em espermatozoides bovinos durante o resfriamento. Com isso, a gema de ovo foi utilizada para prevenir o choque térmico em várias espécies, inclusive em espermatozoides equinos. Estudos subsequentes demonstraram que é a fração de lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo (PACE & GRAHAM, 1974) e a porção de fosfolipídios das lipoproteínas (WATSON, 1976), em particular, que beneficiam os espermatozoides durante o resfriamento. Com isso, lipoproteínas e fosfolipídios de outras fontes (leite, leite desnatado e produtos da soja) têm sido utilizados e testados em diluente para resfriamento de sêmen equino. Um dos principais problemas dos diluentes de sêmen à base de leite ou de gema de ovo é o fato de que esses produtos biológicos consistem de uma variedade de substâncias (PAGL et al., 2006) e por isso podem variar conforme a partida e o tipo de fabricação.

Aurich e colaboradores (2007) testaram três diluentes para resfriamento de sêmen equino: EquiPro a base de caseinatos definidos e proteínas específicas do leite, EquiPro™ contém os mesmos componentes porém comercializado diluído e o AndroMed-E, a base de lecitina da soja. O diluente com lecitina da soja apresentou os menores valores de viabilidade espermática durante os 4 dias de resfriamento.

Na última década, diluentes com composição mais complexas tem sido desenvolvidos, como por exemplo: o INRA-82 de origem francesa que é composto de glicose, lactose e rafinose como açúcares e como tampão, HEPES, citrato de potássio, citrato de sódio e a única fração de leite é os fosfocaseinatos nativos; o INRA-96 (IMV Technologies, L'Aigle Cedex, França) a base também de fosfocaseinatos, HEPES, glicose, sais de Hank e lactose; o EquiPro (Minitüb, Tiefenbach, Alemanha) a base de leite com composição semelhante ao INRA-96; e muitos outros.

2.4 Diluentes à base de leite

Embora não se conheça o exato mecanismo de proteção do leite contra o choque térmico, provavelmente as proteínas do leite agem de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, ou seja, estabilizando as membranas (AMANN & GRAHAM, 1993). De acordo com Batellier et al. (1997), o leite é um fluído biológico com complexa composição, superior a 100.000 moléculas e que a β -lactoglobulina é benéfica, enquanto que a α -lactoalbumina é prejudicial à sobrevivência dos espermatozoides. Batellier et al. (2001) relatam que a proteção conferida pelos componentes do leite estaria relacionada aos seus efeitos antioxidantes.

Os diluentes de sêmen equino a base de leite são os mais populares para o processamento e armazenamento (AURICH, 2008). O uso do leite desnatado como um dos componentes da solução diluente foi primeiramente relatado por Kenney e colaboradores (1975), obtendo 58% de taxa de prenhez para as éguas inseminadas.

Apesar da grande maioria dos meios utilizados para diluição de sêmen equino refrigerado ser composta de leite desnatado e glicose, variações estão comercialmente disponíveis e diferem principalmente quanto à composição de antibióticos e açúcares (SQUIRES et al., 1999; VARNER, 2003).

2.4.1 Tampões

No passado, poucas substâncias adequadas para o uso como tampões de íons de hidrogênio para pH 6 e 8 estavam acessíveis e como resultado, alguns tampões inadequados foram utilizados (GOOD et al., 1966). Atualmente, as principais

substâncias tampão adicionadas aos diluentes de sêmen são bicarbonato de sódio (NaHCO_3), citrato de sódio e HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico). A eficiência das substâncias tamponantes é dependente do pH do meio, sendo que cada substância tampão tem um intervalo ótimo de pH para agir.

As características para uma substância tamponante adequada são: ter pH entre 6 – 8, solubilidade máxima em água, mínima solubilidade em outros solventes, não passar facilmente por membranas biológicas, produzir o mínimo de efeitos, influência mínima da concentração do tampão, temperatura e composição iônica do meio sobre a dissociação do tampão. A substância deve ser estável, os complexos formados com cátions devem ser reversíveis ou não formar complexos, resistentes a degradação enzimática e não enzimática, não devem absorver luz para não interferir em testes que utilizem espectrofotômetro, fácil preparo e baixo custo (GOOD et al., 1966).

Algumas destas características, como polaridade extrema, reduzida penetração de membrana, redução de efeitos de íons e cristabilidade são as características de tampões *zwitteriônicos* (GOOD et al., 1966). Por definição, *zwitterion* é um íon que apresenta cargas positiva e negativa no mesmo grupo de átomos, podendo ser formado por compostos que contêm grupos ácidos e básicos. Juntos, eles são internamente neutralizados e, então, metabolicamente inertes. Um exemplo de tampão do grupo *zwitteriônico* é o tampão HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico).

O pH mais eficiente do bicarbonato de sódio (pH 6,8-7,2), HEPES (pH 7,0-8,0) e mesmo do citrato de sódio (cerca de 8) está próximo do pH do sêmen durante o armazenamento. Conseqüentemente, estes tampões são utilizados com sucesso em uma variedade de diluentes. Do ponto de vista bioquímico, o uso com sucesso do EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) no diluente para sêmen equino é questionável, pois a capacidade de tamponamento ótima deste produto está na faixa de 4-5. Produtos lácteos em diluentes também fornecem alguma capacidade tamponante (AURICH, 2011).

Os tampões *zwitteriônicos*, tais como TES (ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico), HEPES e PIPES (ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfônico)) possuem melhor capacidade tampão do que o TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) (GOOD et al., 1966). Além disso, Crespilho e colaboradores (2013) constataram que os diferentes tampões *zwitteriônicos* não afetam a integridade da membrana dos espermatozoides. No entanto, os espermatozoides incubados em BES (ácido N,N-Bis(2-

hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico) apresentaram maior motilidade do que espermatozoides mantidos em meios contendo HEPES ou MES (ácido 4-morfolínétanosulfônico).

2.4.2 Antibióticos

O pênis do garanhão contém flora microbiana natural que pode contaminar o sêmen durante a ejaculação. Tradicionalmente, os antibióticos foram adicionados aos diluentes para inibir o crescimento bacteriano no sêmen armazenado e proteger a égua da endometrite pós-cobertura (JASKO et al., 1993). No entanto, não somente as bactérias, mas também certos antibióticos podem ter efeitos prejudiciais sobre os espermatozoides, como por exemplo, a gentamicina e sulfato de polimixina B (concentração de 1 g/L ou concentrações mais elevadas), diminuem a motilidade do sêmen durante o resfriamento (JASKO et al., 1992; AURICH & SPERGSE, 2007).

A maioria dos diluentes comerciais disponíveis são oferecidos com ou sem antibióticos. Os antibióticos mais utilizados em diluentes incluem a combinação de penicilina potássica e sulfato de amicacina, gentamicina ou ticarcilina. Idealmente, um antibiótico em um diluente eliminaria todos os microrganismos sem influenciar na qualidade espermática (BRINSKO, 2011).

2.5 pH

Para avaliar a qualidade do diluente, devem ser aferidas a pressão osmótica e o pH (DARENIUS, 1998). O pH do ejaculado equino varia entre 6,8 e 7. O pH de diluentes nesta faixa é tolerado sem efeitos prejudiciais. Os diluentes devem tamponar o pH do sêmen diluído em resposta a produção de substâncias metabólicas dos espermatozoides ou bactérias contaminantes (AURICH, 2011).

O pH do sêmen pode ser influenciado pela estação do ano, frequência de coletas/coberturas e concentração espermática. Existe uma correlação negativa entre o volume seminal e o pH e entre o número de espermatozoides no ejaculado e o pH, quando o número de espermatozoides no ejaculado diminui o pH aumenta (PICKETT et al., 1987).

Geralmente, durante o armazenamento, espermatozoides e bactérias contaminantes produzem metabólitos que podem reduzir o pH do diluente, reduzindo o metabolismo e a motilidade espermática (YÁNIZ et al., 2011). Para evitar que estas alterações aconteçam tampões *zwiteriônicos* devem ser utilizados para diminuir a alteração no pH durante o resfriamento (RASUL et al., 2000), e isso pode ser crucial na preservação do sêmen.

Wendt et al. (2002) avaliaram o efeito do pH do diluente sobre a motilidade do sêmen armazenado a 5°C por 24 horas. Nesse experimento, o sêmen de oito garanhões foi diluído em diluente à base de leite desnatado, glicose e sacarose, com pH ajustado para 6,4; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,6 e 7,8. A motilidade total foi similar entre os tratamentos, porém a motilidade progressiva foi superior na faixa de pH entre 6,4 e 7,4, sendo os melhores resultados obtidos com pH 6,6 e 6,8.

2.6 Osmolaridade

Os espermatozoides equinos têm tolerância osmótica limitada em comparação com outras espécies de mamíferos, tais como bovinos e humanos (SIEME et al., 2008). A osmolaridade do sêmen equino é de aproximadamente 300 mOsm/L e, portanto, a osmolaridade dos diluentes de sêmen pode variar entre 250 e 400mOsm/ L, sem causar perdas significativas. Uma ligeira hiperosmolaridade do diluente parece ser benéfica para a preservação das funções do sêmen. Melhores resultados da longevidade do sêmen são notados com osmolaridade próxima 350 mOsm/L (AURICH, 2011)

O edema do espermatozoide em resposta a tensão hipotônica é uma forma de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática (JEYENDRAN et al., 1984). A viabilidade das células expostas a 150 mOsm kg⁻¹, cai abaixo de 60% (POMMER et al., 2002). A pesquisa de Ball & Vo (2001) demonstrou que a motilidade do sêmen equino reduz para menos de 50% quando as células são expostas à soluções abaixo de 200 ou acima de 400 mOsm kg⁻¹. Além disso, após o retorno a condição isotônica, a motilidade não é diferente da observada quando o sêmen é mantido em condições anisotônicas. Quando em condições hipotônicas, os espermatozoides dobram e enrolam seu flagelo (DREVIUS & ERIKSSON, 2008).

2.7 Plasma seminal

A porção fluída do ejaculado, no qual os espermatozoides estão presentes, é conhecida como plasma seminal (GARNER & HAFEZ, 2004), que é derivado principalmente de secreções do epidídimo e glândulas sexuais acessórias. Estudos comprovam que no plasma seminal existem substâncias moduladoras da resposta inflamatória uterina pós-cobertura, que auxiliam na limpeza uterina de éguas suscetíveis a endometrite pós-cobertura (TROEDSSON, 1999). Além disso, o plasma seminal contém ocitocina e prostaglandinas, que promovem a contração uterina visando o transporte do gameta masculino até o local da fertilização (KATILA, 2001) e substâncias antioxidantes como a cisteína, ergotioneína e glutathione peroxidase, capazes de minimizar os efeitos da peroxidação lipídica (AMANN & GRAHAM, 1993). E também, a superóxido dismutase e a catalase foram identificadas como controladoras do balanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua neutralização (KANKOFER et al., 2005).

Sabe-se que grandes concentrações de plasma seminal no resfriamento do sêmen equino são prejudiciais à motilidade e fertilidade (JASKO et al., 1992). No entanto, a remoção completa do plasma seminal não aumenta a longevidade do sêmen, assim 5% a 20% de plasma seminal deve ser mantida após a centrifugação (JASKO et al., 1992; LOOMIS, 2006). Os efeitos benéficos do plasma seminal podem estar relacionados a suas propriedades antioxidantes que são ainda reforçadas pela interação com o diluente de sêmen (KANKOFER et al., 2005).

Há mais de três décadas se tem conhecimento de que para reduzir os efeitos adversos que o plasma seminal exerce sobre os espermatozoides, o sêmen pode ser diluído com, pelo menos, quatro partes de diluente para uma parte de sêmen de tal modo que o percentual de plasma seminal não exceda 20% (VARNER et al., 1987). Os efeitos adversos do plasma seminal sobre os espermatozoides resfriados podem ser parcialmente atribuídos à atividade das lipases endógenas (CARVER & BALL, 2002).

2.8 Diluição do sêmen

A diluição do sêmen depende da concentração inicial da amostra e do número total de espermatozoides progressivamente móveis. Samper (2009) constatou que o sêmen com 100 milhões de espermatozoides deve ser diluído na proporção 1:3 (sêmen:diluyente). Cada aumento de 50 milhões de sptz/mL irá aumentar a diluição por 1, no entanto quando a concentração é entre 450-500 milhões/mL a taxa de diluição deve ser 1:10. Isso resultará em uma concentração espermática de 25-50 milhões/mL.

O diluyente pode alterar ligeiramente o padrão de motilidade, geralmente aumentando as medidas de velocidade. Depois da diluição inicial, alto percentual de espermatozoides podem apresentar um padrão de motilidade circular, no entanto esse comportamento geralmente se resolve após 5-10 minutos de exposição ao diluyente (VARNER, 2008).

Quando a qualidade do sêmen puro é boa a excelente, os fatores de processamento e manuseio do sêmen que podem ter o maior impacto sobre a qualidade e a fertilidade do sêmen resfriado são a composição do diluyente, curvas de resfriamento e qualidade da embalagem, taxa de diluição e o processo de inseminação (SAMPER, 2009).

2.9 Ação do frio sobre a célula espermática

As alterações caracterizadas por movimento alterado, rápida queda da motilidade espermática, lesões nas membranas, redução do metabolismo, perda de enzimas e de outros componentes intracelulares são caracterizadas como choque térmico e são decorrentes da queda da temperatura em taxas superiores àquelas indicadas para a espécie e ocorrem principalmente de 20°C a 5°C (AURICH, 2005).

As membranas espermáticas são as estruturas mais afetadas pelo choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993). Os danos causados pelo estresse térmico são decorrentes de danos estruturais diretos, como a ruptura de membranas, ou indiretos, por alterações das funções celulares (SQUIRES et al., 1999).

A membrana plasmática afetada pelo frio pode sofrer mudanças na sua permeabilidade, que resulta em alterações funcionais e metabólicas, prejudicando a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (AMANN & GRAHAM,

1993). O resfriamento pode induzir a ruptura acrossomal acarretando redução da fertilidade (BEDFORD et al., 2000). As lipoproteínas da gema de ovo e do leite produzem modificações estruturais na membrana espermática, estabilizando e provocando adaptação do espermatozoide a baixas temperaturas (VARNER et al., 1988).

Nem todos os ganhões podem ser usados no resfriamento de sêmen, a fertilidade irá diminuir quando o sêmen é processado, resfriado e transportado (AURICH, 2008). O resfriamento reduz o catabolismo espermático, o que é necessário para a preservação do ejaculado por longos períodos (SQUIRES et al., 1999).

2.10 Resfriamento do sêmen: curvas de resfriamento e sistemas de resfriamento

O resfriamento diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, diminui as reações químicas, reduz o crescimento e a atividade microbiana resultando no aumento da vida fértil do espermatozoide (PICKETT & AMANN, 1987). A fertilidade do sêmen refrigerado é mantida por 24-48h (JASKO et al., 1992). Se o sêmen for enviado para longas distâncias, este deve ser embalado e resfriado em dispositivo adequado o que irá auxiliar a manter a qualidade do sêmen (BRINSKO et al., 1999). O sêmen pode ser armazenado à temperatura ambiente (20°C) por 12h sem perda significativa da motilidade e capacidade fertilizante (VARNER et al., 1989). E também, se o transporte do sêmen não for superior a 30h e a temperatura ambiente permanecer moderada, resultados satisfatórios podem ser obtidos (MALMGREN, 1998; BRINSKO et al., 1999; NUNES et al., 2008).

Os danos aos espermatozoides são geralmente reduzidos se a taxa de resfriamento é lenta (AMANN & PICKETT, 1987). Ao se resfriar o sêmen de 37°C a 5°C, a taxa de refrigeração deve ser controlada, principalmente entre 19°C e 8°C, intervalo este em que pode ocorrer o choque térmico (MORAN et al., 1992). Os espermatozoides devem ser resfriados lentamente (0,05°C/min) devido ao fato de que nesse intervalo de temperatura a membrana de espermatozoides equinos sofre a transição da fase fluída para o estado de gel (MORAN et al., 1992). A temperatura de 4 a 6°C é geralmente considerada ideal para o armazenamento do sêmen equino (VARNER et al., 1988; VARNER et al., 1989).

O aumento da popularidade do transporte de sêmen criou o mercado de *containers*. Diversos modelos adaptados especificamente para resfriamento e transporte de sêmen estão disponíveis comercialmente, todos com sistema passivo de resfriamento. O Equitainer® (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984) é mais utilizado mundialmente para resfriamento e transporte. Os sistemas passivos possuem a vantagem de serem mais baratos, porém possuem taxa de refrigeração dependente de fatores como a temperatura ambiente, o volume e a temperatura inicial da amostra. Já os sistemas ativos possuem taxas de refrigeração pré-determinadas, porém possuem custo elevado (VALLE et al., 1999). Os *containers* devem ter completo isolamento térmico do meio exterior, obtenção de taxa de resfriamento lenta, proteger o sêmen, ter estrutura forte, serem simples, baratos, leves e de fácil manuseio.

A temperatura ambiente à qual os *containers* são expostos tem impacto sobre as taxas de resfriamento e temperatura final de estocagem da amostra em seu interior, influenciando algumas características seminais (MALMGREEN, 1998). O estudo conduzido por Brinsko et al. (2000) avaliou o efeito do armazenamento em *containers* e diferentes temperaturas ambiente (-20°C, 22°C e 37°C) demonstrando que a motilidade espermática é mantida adequadamente na maioria dos *containers* disponíveis comercialmente quando a temperatura ambiente está entre 22°C e 37°C. No entanto, a temperatura ambiente de -20°C por 6h resulta em redução na motilidade espermática na maioria dos *containers*.

2.11 Variação individual

Um fator importante que afeta a longevidade dos espermatozoides equinos durante o armazenamento e transporte é o próprio garanhão (AURICH, 2008). Há uma variação considerável entre garanhões na forma como seu sêmen mantém a capacidade de fertilização após o congelamento e descongelamento (KATILA, 2001). Garanhões, ou até mesmo ejaculados, mostram variações consideráveis na sua sensibilidade ao choque térmico o que pode estar relacionado a diferenças no teor de colesterol da membrana plasmática (CROSS, 1998).

Os garanhões podem ser classificados como "bons" ou "maus" resfriadores baseado na adequação de sêmen para ser utilizado para resfriamento e transporte

(BRINSKO et al., 2000). Isso não depende apenas da qualidade do sêmen puro, mas também da composição da membrana plasmática dos espermatozoides e do plasma seminal (AURICH, 2005).

O aumento no número de montas e o tempo de espera do garanhão até a ejaculação resultam em aumento no volume e na contagem total de espermatozoides e também na diminuição da concentração de espermatozoides no ejaculado (AURICH, 2008). O tempo e o número de montas até o sucesso da coleta de sêmen é influenciado pela libido do garanhão, ambiente e prática de coleta de sêmen. Pessoal inexperiente, juntamente com ambiente e equipamentos inadequados são os piores pré-requisitos para a coleta de sêmen destinado a transporte e resfriamento. Montas repetidas não só afetam a composição do sêmen e da qualidade em si, mas também aumentam a probabilidade de que sêmen seja contaminado por bactérias da superfície genital do garanhão (AURICH & SPERGSER, 2007; PRICE et al., 2008).

Em garanhões com baixa qualidade de sêmen após resfriamento, diferentes diluentes devem ser testados para encontrar a combinação diluente-sêmen ideal para este garanhão especificamente (AURICH, 2008).

2.12 Peroxidação Lipídica dos espermatozoides

Devido ao alto teor de ácidos graxos insaturados, os espermatozoides de mamíferos são propensos ao estresse oxidativo (KODAMA et al., 1996) que promove mudanças na fluidez da membrana e estas levam à diminuição da capacidade de fertilização. A perda de motilidade e capacidade de fertilização pode, em parte, ser atribuída a processos de peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (AITKEN, 1994; STOREY, 1997).

Durante o metabolismo fisiológico dos espermatozoides, tanto a respiração anaeróbia (glicólise) e aeróbia (ciclo do ácido tricarboxílico) convertem monossacarídeos em ATP, que é utilizado para o movimento dos espermatozoides. Resíduos metabólicos, tais como o ácido lático e espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio), podem danificar irreversivelmente as células (GRAHAM, 2011).

Em ejaculados coletados e no sêmen processado, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são induzidas principalmente pela contaminação por leucócitos e por espermatozoides com excesso de citoplasma residual (AITKEN & BAKER, 2004; BROUWERS et al., 2005). Além disso, sabe-se que os próprios espermatozoides produzem EROs intracelularmente como resultado da atividade flagelar (GAVELLA & LIPOVAC, 1992).

Enquanto a peroxidação leve parece ser um mecanismo fisiológico para promover a capacitação do espermatozoide, a excessiva peroxidação pode danificar a membrana plasmática e resultar em perda de motilidade e/ou capacidade de fertilização do sêmen (AITKEN & BAKER, 2004). Isso aumenta a permeabilidade da membrana e, assim, diminui a atividade metabólica da célula, devido à penetração das enzimas, substratos, co-fatores de nucleótidos e ATP (STOREY, 1997). Portanto, a perda da motilidade está relacionada não só com a peroxidação de lipídios da membrana plasmática, mas também com a redução no fornecimento de energia através das mitocôndrias, devido à depleção de ATP (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992; RUIZ-PESINI et al., 1998). As alterações espermáticas causadas pelo envelhecimento podem ser decorrentes de instabilidade nuclear, perda de componentes intracelulares e, em especial, a peroxidação lipídica (AMANN & GRAHAM, 1993).

Os espermatozoides e o plasma seminal são dotados de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa contra EROs. Os mecanismos enzimáticos incluem glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Os sistemas de defesa contra EROs são baseados em uma ação combinada das enzimas antioxidantes e antioxidantes não enzimáticos (KANKOFER et al., 2005).

Dois métodos podem ser utilizados para reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e ácido lático, estas incluem: a suspensão dos espermatozoides em diluentes que não contêm oxigênio, forçando assim as células a respiração anaeróbica; e o resfriamento do sêmen que diminui o metabolismo celular e também ocasiona a respiração anaeróbica após aproveitamento de todo o oxigênio presente no meio (GRAHAM, 2011).

2.13 Técnicas de avaliação de sêmen

A abordagem convencional para avaliação de sêmen equino foi elaborada há várias décadas e inclui a avaliação da concentração espermática, volume de sêmen, características morfológicas e os padrões de motilidade dos espermatozoides inicialmente e após armazenamento *in vitro* (VARNER, 2008). Para calcular o número total de espermatozoides no ejaculado é necessário mensurar o volume e determinar a concentração espermática. O volume é composto da fração gel e da fração livre de gel, usualmente sua mensuração é efetuada em provetas graduadas e a concentração espermática é calculada através da fração sem gel.

2.13.1 Motilidade Espermática

A motilidade é o parâmetro mais comumente utilizado na avaliação de sêmen, em laboratórios e fazendas, porque é facilmente acessível e rápido de executar (KATILA, 2001). Essa avaliação, no sêmen puro e diluído é considerada um teste laboratorial fundamental para avaliar a capacidade de fertilização de espermatozoides de um ejaculado. A avaliação do sêmen puro e não diluído fornece uma indicação de como os espermatozoides se comportam no seu fluido natural (VARNER, 2008). A correlação entre a motilidade e fertilidade é, no entanto, variável e baixa (SAMPER et al., 1991).

A avaliação da motilidade consiste na observação do padrão de movimentação dos espermatozoides usualmente efetuada sob microscópio de contraste de fase. A motilidade dos espermatozoides é extremamente suscetível às condições ambientais (por exemplo, excesso de calor ou frio, lubrificantes, luz, desinfetantes, osmolaridade/pH do diluente de sêmen), por isso é necessário proteger o sêmen de agentes ou condições prejudiciais antes da análise (VARNER, 2008). A avaliação da motilidade também é dependente da experiência do avaliador por isso pode ser considerada um método subjetivo de avaliação.

Várias técnicas e instrumentos distintos foram desenvolvidos em um esforço para garantir uma avaliação objetiva (ou seja, imparcial) da motilidade. No entanto, estes métodos (por exemplo, espectrofotômetro, análise computadorizada) são geralmente considerados muito tediosos ou caros para uso rotineiro. Os sistemas computadorizados

estão atualmente em vigor em muitos laboratórios de referência com a intenção de avaliar objetivamente as características de movimentação dos espermatozoides (VARNER, 2008). Apesar da disponibilidade comercial de vários sistemas de análise assistida por computador (CASA), a sua presença não tem proporcionado o ensaio definitivo para medir o potencial de fertilização dos espermatozoides (AMANN & KATZ, 2004).

2.13.2 Funcionalidade da Membrana – Teste Hiposmótico

As membranas biológicas são as responsáveis pela homeostase celular através de suas trocas com o meio externo (DELL'AQUA et al., 2002). Quando o espermatozoide é colocado em uma solução hiposmótica, a água entra no espermatozoide na tentativa de alcançar o equilíbrio osmótico (JEYEDRAN et al., 1984).

O flagelo do espermatozoide, por apresentar uma membrana mais frágil do que a presente na região da cabeça, parece ser suscetível a estas condições de teste hiposmótico (VAZQUEZ et al., 1997). Esta capacidade do flagelo de se dobrar na presença de uma solução hiposmótica indica que o transporte de água através da membrana ocorre de forma fisiológica e que a membrana se encontra íntegra e com funcionalidade (FUSE et al., 1993).

O teste hiposmótico (HOST) é um método simples, prático e confiável que tem sido comumente utilizado nas avaliações rotineiras de sêmen equino (ARRUDA et al., 2011). Em equinos, o uso da água destilada aquecida a 38°C foi adaptado por Lagares e colaboradores (2000) para a avaliação da funcionalidade de membrana espermática. Para isso, a proporção de 1:3, ou seja, uma parte de sêmen e duas de água destilada deve ser utilizada, perfazendo a osmolaridade aproximada de 100mOsm.Kg H₂O⁻¹.

A determinação da integridade funcional da membrana plasmática tem sido objetivo de vários estudos. Os primeiros trabalhos foram realizados através de esfregaços corados, principalmente com eosina ou a combinação de eosina com nigrosina (HANCOCK, 1951; CAMPBELL et al., 1956; DOTT & FOSTER, 1972). Atualmente, diferentes colorações fluorescentes como, por exemplo, iodeto de propídio (PI), carboxyfluoresceindiacetato (CFDA) ou SYBR-14 são usados e foram validados

para o sêmen equino (GARNER et al., 1986; HARRISON & VICKERS, 1990; HARKEMA & BOYLE, 1992).

2.13.3 Atividade mitocondrial através da redução do Tetrazolium (MTT)

O MTT (3 [4,5-dimetiltiazol-2-y1]-2,5-difeniltetrazólio bromido) é um sal tetrazólico amarelo solúvel em água. Esse corante amarelo é convertido em formazan púrpura, insolúvel em água, através da clivagem redutora do anel tetrazólico pela sistema da succinato desidrogenase das mitocôndrias ativas (SLATER et al., 1963). Assim, a quantidade de formazan formado pode ser determinada através de espectrofotômetro e serve como estimativa do número de mitocôndrias e, por conseguinte, o número de células vivas na amostra (DENIZOT & LANG, 1983).

2.13.4 Peroxidação lipídica detectada através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Após a ejaculação e durante a manipulação, o sêmen fica exposto a diversos fatores, sobretudo ao processo de peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática promovido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) (BOE-HANSEN et al., 2005; FUNAHASHI & SANO, 2005; KANKOFER et al., 2005).

Ball et al. (2001) apontam para a importância do estresse oxidativo causado pelas EROs sobre a função espermática do sêmen preservado por longos períodos, sugerindo que a H_2O_2 parece ser a espécie reativa de oxigênio que provoca maiores danos aos espermatozoides caracterizados pela perda de motilidade.

Os resíduos metabólicos, como ácido lático e/ou CO_2 , podem aumentar a acidez do sêmen causando prejuízos celulares irreversíveis pela peroxidação dos lipídios da membrana. Uma leve oxidação parece promover a capacitação, entretanto o estresse oxidativo acarreta prejuízos à membrana que resultam em perda da motilidade e redução da fertilidade (AURICH, 2005).

Kankofer et al. (2005) estudando a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico como indicador da peroxidação lipídica não detectaram aumento desta substância durante a estocagem do sêmen equino a $5^\circ C$ por 24 horas, concluindo que a

peroxidação lipídica não aumentava substancialmente durante o armazenamento do sêmen nestas condições, conferindo, assim, maior longevidade aos gametas. O protocolo utilizado para medir a peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi adaptado para equinos por Stradaioli et al. (2001).

3 CAPÍTULO 1

Diluição e temperatura de resfriamento alteram o pH e a viabilidade de espermatozoides equinos

J. M. Trentin*, M. F. Rodrigues, G. A. Pessoa, L. B. Araujo, R. O. Schenatto, M. L. Jardim, K. V. Aires, M. I. B. Rubin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

*autor para correspondência: janislenetrentin@yahoo.com.br

RESUMO

Neste estudo avaliou-se o efeito da diluição e da temperatura de resfriamento sobre a motilidade, integridade de membrana, pH e atividade mitocondrial do sêmen resfriado. O sêmen de nove pôneis da raça Brasileira foi diluído em diluente a base de leite desnatado e sem tampão, mantido refrigerado a 5 ou 15°C por 48h em três diferentes diluições (1+1, 1+2, 1+3), sendo utilizados dois ejaculados/pônei. As três diluições não alteraram os parâmetros de motilidade, hiposmótico, atividade mitocondrial e pH a fresco ($P > 0.05$). A diluição 1+1 resultou em valores maiores de pH (7,63 e 7,57) e menor motilidade progressiva, tanto a 5 quanto a 15°C. Maior percentual de células íntegras (1+1=44,16; 1+2=48,16; 1+3=50,05) foi detectado a 15°C ($P < 0.01$) independentemente da diluição. A atividade mitocondrial foi superior na diluição 1+3 (0,86nm) a 5°C e na 1+1 (0,89nm), 1+2 (0,93nm) e 1+3 (0,92nm) a 15°C. A motilidade progressiva foi maior ($P < 0.05$) com 48h de resfriamento (39,72%) quando o sêmen foi diluído a 1+3 e refrigerado a 15°C. A avaliação da atividade mitocondrial não revelou diferenças ($P > 0.05$) entre as diluições em função do tempo e temperatura. Na análise do sêmen a fresco, a motilidade progressiva, pH, integridade de membrana e a atividade mitocondrial foram similares nas três diluições utilizadas. Entretanto, os melhores resultados em todos os parâmetros avaliados foram obtidos com o resfriamento do sêmen a 15°C e com a diluição 1+3. Sugere-se que, quando da utilização do sêmen a fresco, qualquer das diluições aqui testadas pode ser utilizada com segurança. O resfriamento do sêmen diluído durante 48 horas modifica e eleva o pH do sêmen.

Palavras-chave: diluente, equino, sêmen, resfriamento

ABSTRACT

The effect of dilution and cooling temperature was investigated based on pH, sperm motility, membrane integrity and mitochondrial activity on analysis before and after cooling. Ejaculates of nine Brazilian ponies, two ejaculates per pony, were diluted in a non-buffered powder milk extender, cooled at 5°C or 15°C during 48h using three

different dilutions (1+1, 1+2 and 1+3). No dilution interfered with pH, motility, membrane integrity and mitochondrial activity of fresh semen. Samples diluted 1+1, at 5 or 15°C, showed higher pH values (7.63 e 7.57) and lower progressive motility. All samples cooled at 15°C also showed a lower incidence of morphologically altered spermatozoa (1+1 = 55.84%; 1+2 = 51.84%; 1+3 = 49.95%) ($P < 0.01$). Mitochondrial activity was higher in 1+3 dilution (0.86 nm) at 5°C and 1+1 (0.89nm), 1+2 (0.93nm), 1+3 (0.92nm) dilutions at 15°C. Progressive motility was higher when semen was cooled during 48h in 1+3 dilution at 15°C (39.72%; $P < 0.05$). Considering mitochondrial activity no differences were observed when different dilutions of semen were used ($P > 0.05$) a despite of time and temperature. There was similarity between dilution grades on fresh semen when pH, progressive motility, mitochondrial activity and membrane integrity were considered ($P > 0.05$). Although, the best results were obtained when semen was diluted 1+3 and cooled at 15°C. It was concluded that, when using fresh semen, all dilution grades herein are safe and that pH is influenced and increased when semen is extended and cooled for 48h.

Keywords: extender, equine, semen, cooling

INTRODUÇÃO

O transporte de sêmen refrigerado tem sido utilizado rotineiramente nos últimos 20 anos. Hoje, a maioria das associações de raça de equinos permite o uso da inseminação artificial e a criação de equinos tem usufruído dos benefícios desta biotécnica (AURICH & AURICH, 2006). Há mais de duas décadas busca-se aperfeiçoar um protocolo para o transporte de sêmen equino refrigerado (HECKENBICHLER et al., 2011), já que a temperatura, o tempo de armazenamento, o diluente, a diluição e a curva de resfriamento comprometem a sua capacidade de fertilização (VIDAMENT et al., 2012).

A manutenção da viabilidade espermática por pelo menos 24h é fundamental, pois este é o tempo comumente necessário para que as amostras de sêmen sejam recebidas pelos destinatários (SQUIRES et al., 1999). No Brasil, pela sua extensão e pela precariedade de infraestrutura dos transportes esse prazo pode se estender às 48h. Este intervalo entre a coleta e a utilização conduz à constante procura para melhorar a capacidade de manutenção da viabilidade espermática. Para a avaliação da viabilidade são utilizados testes de motilidade espermática, teste hiposmótico (LAGARES et al., 2000) que permitem avaliar a função da membrana plasmática e a atividade mitocondrial (AZIZ et al., 2005). O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da

temperatura de 5° ou 15°C e o de distintas diluições do sêmen assim resfriado por até 48h sobre a viabilidade dos espermatozoides de pôneis da raça Brasileira.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram conduzidos de Janeiro a Junho de 2013 no Laboratório de Embriologia Animal da Universidade Federal de Santa Maria – RS, Brasil. Nove pôneis da raça Brasileira, com faixa etária entre 9 e 13 anos foram submetidos à coleta do sêmen através da vagina artificial, rotineiramente, antes e durante o estudo.

Dois ejaculados de cada um dos nove pôneis foram obtidos com vagina artificial modelo Hannover (GÖTZE, 1949). As coletas foram conduzidas de acordo com os procedimentos descritos por Klug & Sieme (2003).

As análises macroscópicas de aspecto e volume do ejaculado foram efetuadas imediatamente após a coleta. O diluente utilizado foi adaptado de Kenney et al. (1975) e compunha-se de 2,4g de leite desnatado (em pó), 4,9g de glicose (D(+)-Glicose Anidra, Merck) e 95mL de água ultrapura. Cada ejaculado foi dividido em seis frações e diluído a 1+1 (sêmen+diluente), 1+2 e 1+3. Na sequência, imediatamente após a diluição, as amostras foram submetidas à avaliação da motilidade, concentração, função de membrana plasmática (Hiposmótico - HOST), pH e atividade mitocondrial (MTT). Após a análise inicial, os tubos foram mantidos em geladeira regulada para $5 \pm 1,6^{\circ}\text{C}$ e em Botubox® a 15°C por 24 e 48h. A velocidade de resfriamento em geladeira variou entre 0,6 a $0,8^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. As mesmas avaliações foram realizadas às 24h e 48h de resfriamento através da retirada de uma amostra suficiente para todo procedimento diminuindo a exposição do material resfriado à temperatura ambiente por muito tempo. As avaliações foram conduzidas após 15 minutos de aquecimento das amostras em mesa térmica ajustada a 37°C .

A concentração espermática foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer. A avaliação da motilidade espermática foi efetuada de acordo com Varner (1989). Na avaliação da funcionalidade da membrana espermática utilizou-se o protocolo descrito por Lagares et al. (2000). O protocolo descrito por Neild (2000) foi adotado para classificar a morfologia das células espermáticas. O pH foi aferido no sêmen fresco diluído e nas 24h e 48 h de resfriamento (pH Meter Tec-2, Tecnal).

Para a avaliação da atividade mitocondrial, uma amostra de cada grupo foi centrifugada a 600 x g por 10 minutos e ajustada para a concentração de 100×10^6 spztz/mL. Duas alíquotas de 200 μ L da amostra contendo 100×10^6 células/mL foram depositados em tubos de microcentrífuga de 2mL. Na sequência, 20 μ L da solução de Tetrazolium (5mg/mL de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (M2128, Sigma-Aldrich) em PBS salino foi adicionado a esses tubos para proceder a incubação por 30 minutos em banho-maria a 37°C.

A cada tubo de microcentrífuga adicionou-se 200 μ L de solução de 0,04N de HCl em Isopropanol. Em seguida, cada alíquota foi centrifugada a 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade metabólica mitocondrial em espectrofotometria de luz visível com comprimento de onda de 540 nm, considerando o branco a solução de diluente com leite desnatado e glicose + Tetrazolium + 0,04N HCl-isopropanol. As alíquotas de cada garanhão foram analisadas em duplicatas.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFSM protocolo n°065/2013. O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita através do Teste de Duncan.

RESULTADOS

A média do volume dos ejaculados dos nove pôneis utilizados foi $15,69 \pm 12,81$ mL e a concentração total foi $330,83 \pm 208,79 \times 10^6$ spztz/mL. A média da concentração e o desvio-padrão respectivamente da diluição 1+1 foi $165,41 \pm 104,39 \times 10^6$ spztz/mL, da diluição 1+2 foi $110,27 \pm 69,59 \times 10^6$ spztz/mL e na diluição 1+3 foi $82,70 \pm 52,19 \times 10^6$ spztz/mL. O volume médio e desvio padrão dos tubos na diluição 1+1 foi $10,46 \pm 8,54$ mL, na diluição 1+2 foi $15,69 \pm 12,81$ mL e na diluição 1+3 foi $20,93 \pm 17,09$ mL.

Levando em consideração a temperatura e as diluições, na avaliação imediata após a coleta, não se observou alteração nos valores de motilidade progressiva, hiposmótico, atividade mitocondrial e pH ($P > 0.05$) nas três diluições do sêmen. Valores superiores de motilidade progressiva (MP; $P < 0.0001$) e menores valores de pH ($P < 0.001$) foram

obtidos pelas diluições 1+2 e 1+3, tanto a 5°C quanto a 15°C comparada a diluição 1+1. Detectou-se que o maior percentual de células espermáticas com membrana íntegra ocorreu a 15°C, mas não diferiu entre as três diluições (Tabela 1). A atividade mitocondrial foi superior ($P = 0.0006$) a 15°C. O maior valor de pH foi detectado na diluição 1+1 tanto a 5°C como a 15°C.

Tabela 1. Médias e desvios-padrões da motilidade progressiva, teste hiposmótico, atividade mitocondrial e pH de sêmen de pôneis da raça Brasileira submetido a três diferentes diluições a fresco e resfriado a 5°C e 15°C por 48h.

Diluição Conservação	1+1	1+2	1+3	Valor de P
Motilidade Progressiva				
A fresco	68,61 ± 5,63 ^a	68,33 ± 7,07 ^a	68,88 ± 5,3 ^a	
5°C	10,3 ± 11,05 ^e	30,55 ± 14,91 ^d	36,94 ± 14 ^{cd}	< 0.0001
15°C	17,08 ± 9,95 ^b	35,97 ± 15,80 ^{cd}	42,22 ± 12,38 ^c	
Hiposmótico				
A fresco	62,22 ± 9,4 ^c	61 ± 9 ^c	60,88 ± 11,11 ^c	
5°C	30,16 ± 14,31 ^e	35,55 ± 13,2 ^e	35,75 ± 13,73 ^e	<0.0001
15°C	44,16 ± 14,59 ^d	48,16 ± 13,52 ^d	50,05 ± 11,36 ^d	
MTT (nm)				
A fresco	1 ± 0,26 ^e	0,91 ± 0,18 ^{ed}	0,93 ± 0,17 ^{ed}	
5°C	0,74 ± 0,2 ^c	0,84 ± 0,22 ^{bc}	0,86 ± 0,19 ^{cde}	0.0006
15°C	0,89 ± 0,23 ^{de}	0,93 ± 0,2 ^{de}	0,92 ± 0,20 ^{de}	
pH				
A fresco	7,25 ± 0,17 ^a	7,13 ± 0,21 ^a	7,12 ± 0,15 ^a	
5°C	7,63 ± 0,34 ^e	7,46 ± 0,21 ^{cd}	7,38 ± 0,11 ^{bc}	< 0.0001
15°C	7,57 ± 0,27 ^{de}	7,37 ± 0,22 ^{bc}	7,31 ± 0,15 ^c	

a, b, c letras diferentes significam diferença ($P < 0.05$) nas linhas e nas colunas

No momento da avaliação do resfriamento do sêmen às 24 e 48h submetido a três diluições, as amostras diluídas à 1+1, independente da temperatura (Tabela 2) apresentaram maior valor de pH (7,65 e 7,55, $P < 0.01$) e resultou em menor percentual de motilidade progressiva (19,16% e 8,22%, respectivamente). Nas diluições 1+2 e 1+3 as 24h observou-se motilidade progressiva e pH semelhantes entre os tratamentos. No teste de função de membrana e da atividade mitocondrial os resultados foram semelhantes nas três diluições, tanto nas 24 como nas 48h de resfriamento.

Nas 48h de resfriamento, a diluição 1+3 apresentou maior percentual de células com motilidade progressiva (35,55%, $P < 0.05$). Nas diluições 1+2 e 1+3 foram observados valores menores de pH.

Tabela 2. Médias e desvios padrões da motilidade progressiva, teste hiposmótico, atividade mitocondrial e pH em três diluições, avaliados a fresco, 24h e 48h após resfriamento do sêmen de pôneis da raça Brasileira a 5 e 15°C.

Diluição	1+1	1+2	1+3	Valor de P
Conservação				
<i>Motilidade Progressiva</i>				
A fresco	68,61 ± 5,63 ^a	68,33 ± 7,07 ^a	68,88 ± 5,3 ^a	< 0.0001
24 h	19,16 ± 10,85 ^c	39,72 ± 13,51 ^{dc}	43,61 ± 11,62 ^d	
48 h	8,22 ± 8,09 ^{2b}	26,8 ± 14,79 ^f	35,55 ± 13,97 ^c	
<i>Hiposmótico</i>				
A fresco	62,22 ± 9,4 ^a	61 ± 9 ^a	60,88 ± 11,11 ^a	<0.0001
24 h	43,91 ± 14,81 ^{d^e}	46,05 ± 13,33 ^e	46,52 ± 13,56 ^e	
48 h	30,41 ± 14,33 ^c	37,66 ± 15 ^{cd}	39,27 ± 14,57 ^{cd}	
<i>MTT</i>				
A fresco	1 ± 0,26 ^a	0,91 ± 0,18 ^{abc}	0,93 ± 0,17 ^{ab}	0.03
24 h	0,86 ± 0,21 ^{ac}	0,9 ± 0,23 ^{abc}	0,9 ± 0,21 ^{abc}	
48 h	0,78 ± 0,24 ^c	0,87 ± 0,2 ^{abc}	0,89 ± 0,19 ^{abc}	
<i>pH</i>				
A fresco	7,25±0,17 ^{ab}	7,13±0,21 ^a	7,12±0,15 ^a	<0.001
24 h	7,65 ± 0,34 ^e	7,45 ± 0,24 ^{cd}	7,39 ± 0,12 ^{bc}	
48 h	7,55 ± 0,27 ^{de}	7,39 ± 0,2 ^{bc}	7,3 ± 0,14 ^b	

a, b, c letras diferentes significam diferença (P < 0.05) nas linhas e nas colunas

A motilidade progressiva avaliada a fresco nas três diluições não revelou diferenças (Figura 1). Nas 24h e 48h, verificou-se que na diluição 1+1 a motilidade progressiva foi menor, tanto a 15°C como a 5°C. Nas 24h não houve diferença na MP tanto a 5°C como a 15°C (P > 0,005), melhorando a partir da diluição 1+2. Nas 48h, a diluição 1+3 a 15°C apresentou MP mais elevada que a 5°C (P < 0.001).

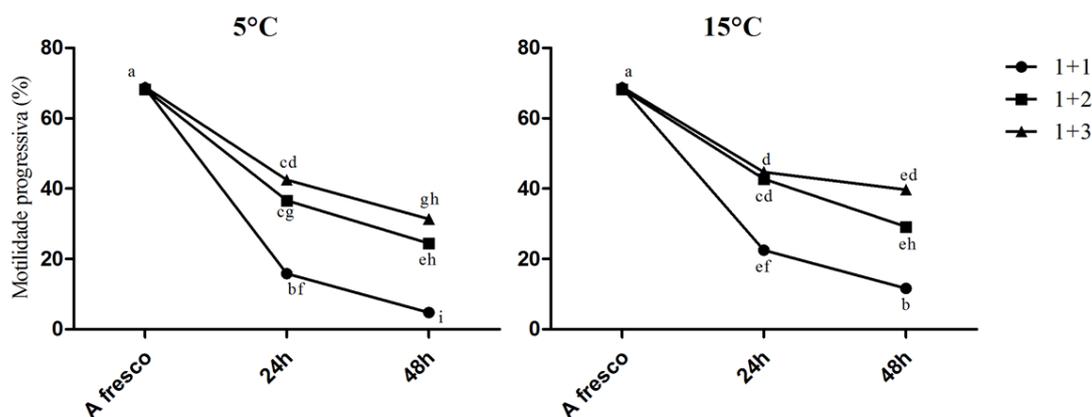


Figura 1. Motilidade progressiva de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira em diluente a base de leite em pó desnatado em três diferentes diluições (1+1, 1+2, 1+3) e resfriados a 5°C e 15°C (P < 0.001).

No teste hiposmótico verificou-se que após 24 e 48h de resfriamento os melhores resultados foram observados à temperatura de 15°C, verificando-se nesta temperatura similaridade entre as diluições (Figura 2) e a fresco.

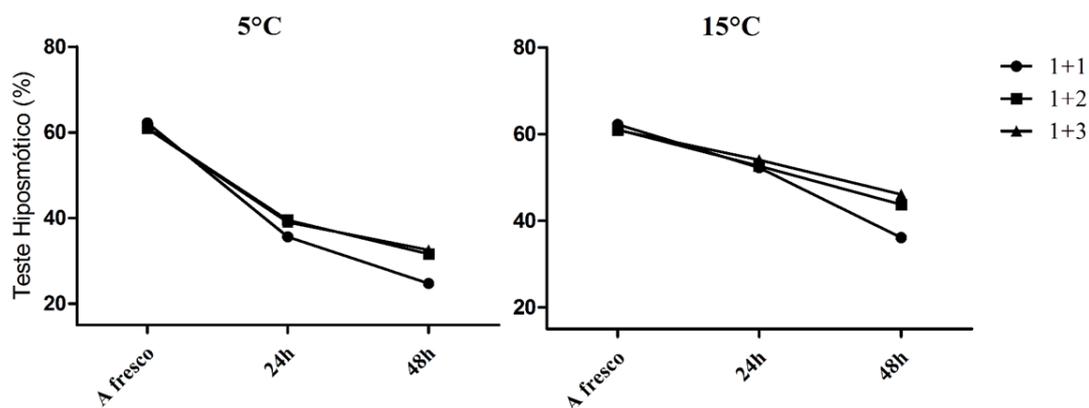


Figura 2. Percentual de espermatozoides reagentes ao teste hiposmótico a fresco e após 24h e 48h de resfriamento do sêmen de pôneis da raça Brasileira a 5°C ou 15°C em três diferentes diluições ($P < 0.001$).

Os resultados da avaliação da atividade mitocondrial através da leitura dos valores de absorbância geradas pelas amostras em relação ao tempo e a temperatura (Figura 3) indicaram similaridade entre as diluições no sêmen avaliado a fresco e após 24h e 48h de resfriamento.

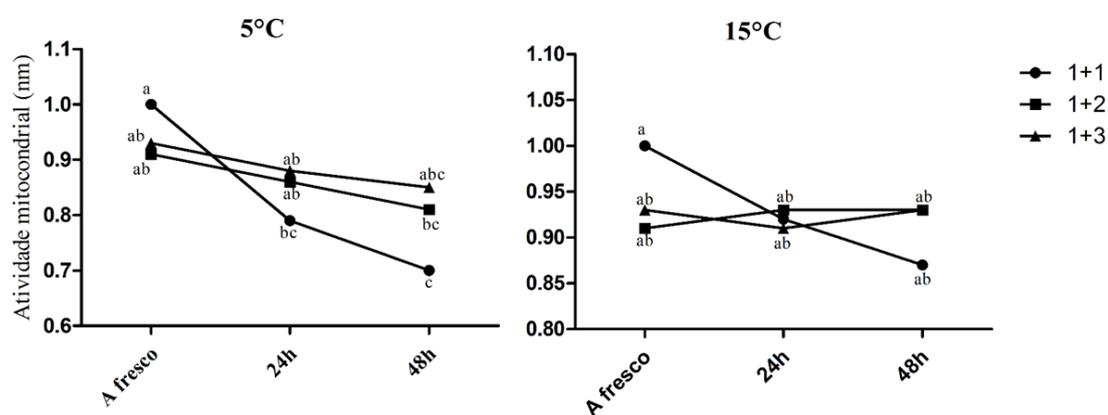


Figura 3. Absorbância da atividade mitocondrial dos espermatozoides de pôneis da raça Brasileira resfriados a 5°C, 15°C e a fresco diluídos em três diferentes diluições ($P = 0.049$).

O pH avaliado a fresco das amostras preparadas nas três diluições foi menor do que o observado nas 24h e 48h após resfriamento, não havendo diferença significativa entre as diluições (Figura 4). Na diluição 1+1 observou-se maiores valores de pH e nas diluições 1+2 e 1+3 os resultados foram similares, tanto a 5°C quanto a 15°C, nas 24h ou 48h de resfriamento.

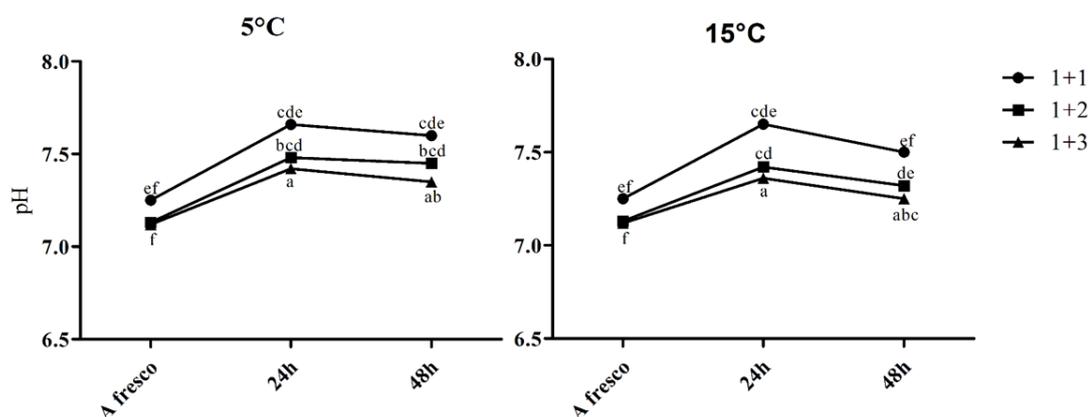


Figura 4. Valores de pH do sêmen de pôneis da raça Brasileira diluído em três diferentes diluições a fresco e após 24h e 48h de resfriamento a 5 e 15°C ($P < 0.0001$).

DISCUSSÃO

O sêmen equino, quando armazenado ou transportado, é usualmente mantido por 12h a 48h a 5°C. Isso se deve à facilidade logística de manutenção da temperatura ao redor dos 5°C. Os resultados aqui observados demonstram que o resfriamento é prejudicial à viabilidade do sêmen. Na presente pesquisa, os melhores resultados foram detectados quando o sêmen em diluente a base de leite em pó desnatado foi mantido a temperatura de 15°C, corroborando aqueles descritos por Province et al. (1985) em estudo sobre o efeito do resfriamento em quatro temperaturas durante 36h e com três diluentes diferentes. Na referida pesquisa, independente do diluente utilizado a motilidade do sêmen estocado a 20°C e 15°C foi superior ao estocado a 10°C ou 5°C em diluente semelhante ao aqui utilizado.

O movimento progressivo (MP) dos espermatozoides nas 24h de resfriamento foi similar tanto a 5°C, quanto a 15°C. No entanto, Varner et al. (1988) e Varner et al. (1989) demonstraram que o resfriamento entre 4°C e 5°C por 24h resultou em maior

motilidade espermática que entre 20°C e 25°C, com taxa de prenhez de 73% para ambas temperaturas. Já Price et al., (2008) não observaram diferença entre a MP no sêmen diluído a 5°C ou a 15°C após 48h de armazenamento. Resta esclarecer se a adição de gentamicina ao diluente, que bloqueou o crescimento bacteriano, pode ter favorecido esta resposta.

Em 1998, Ball observou redução significativa da fertilidade quando o sêmen foi estocado por 24h a 20°C, comparada a preservação a 5°C. Love et al. (2001) resfriaram o sêmen de 18 garanhões em diluente a base de leite desnatado, a temperatura de 5°C e 20°C de 7h até 46h e verificaram que 20°C preservou melhor a integridade da cromatina espermática. O resfriamento, quando efetuado entre 4 a 5°C diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, reduz o crescimento microbiano e, conseqüentemente, mantém a viabilidade dos espermatozoides por longos períodos (KATILA, 1997).

Vidament et al. (2012), sob condições laboratoriais, armazenaram o sêmen equino durante 72 h a 5°C sem exposição ao ar ou a 15°C com exposição ao ar com resultados semelhantes de fertilidade para ambas temperaturas. Estudos *in vitro* conduzidos com sêmen equino em diluentes à base de leite e armazenados por 24h em diferentes tipos de recipientes descartáveis e em diferentes temperaturas sugerem que a motilidade é afetada se a temperatura interna do recipiente é inferior a 2°C ou acima de 20°C (MALMGREN, 1998; BRINSKO et al., 2000). Ademais, Brinsko et al. (2000) e Vidament et al. (2012) sugerem que o sêmen equino é capaz de tolerar ampla gama de taxas de resfriamento e temperaturas de armazenamento, o que também foi aqui comprovado.

Na avaliação da motilidade progressiva do sêmen diluído e não refrigerado (a fresco) detectou-se que houve similaridade entre as diluições 1+1, 1+2 e 1+3. Nas 24 e 48h após o resfriamento observou-se que a diluição 1+1 resultou em menor motilidade progressiva ($P < 0,001$). O movimento progressivo foi similar nas diluições 1+2 e 1+3 com 24h de resfriamento e, nas 48h, a diluição 1+3 resultou em maior motilidade progressiva. Logo, para o transporte até 48h, a temperatura de 15°C e a diluição 1+3 seriam mais adequadas, já que essas diluições apresentaram a menor variação de pH, indicando que conforme se aumenta o grau de diluição se favorece a viabilidade espermática em sêmen resfriado. Jasko et al., (1992) utilizando um diluente a base de gema de ovo afirmaram que a diluição do sêmen nas proporções entre 1:4 a 1:19 são

adequadas para a preservação do sêmen equino a 5°C e que o aumento da diluição favorece a viabilidade espermática.

Os efeitos positivos dos diluentes para sêmen são baseados no controle de pH, da osmolaridade e do fornecimento de energia (PAGL et al., 2006). A ausência de um componente tamponado no diluente aqui utilizado pode ter ocasionado as variações do pH do sêmen resfriado. Nossos resultados da avaliação do pH indicam claramente que o armazenamento e a temperatura influenciam no pH do sêmen resfriado em diluente a base de leite desnatado (em pó) e glicose. O pH elevou-se nas 24h e diminuiu nas 48h de armazenamento a 5°C e a 15°C e isso pode ter ocasionado redução da motilidade progressiva, além da redução da motilidade esperada devido ao resfriamento e ao tempo. A temperatura de 5°C manteve o pH elevado nas 24 e 48 horas de resfriamento, já a 15°C ocorreu elevação nas 24h tornando a diminuir nas 48h, sem no entanto atingir o mesmo valor do pH do sêmen a fresco. Isso sugere que há necessidade da adição de um tampão ao diluente para que o pH não exerça influência negativa sobre a viabilidade dos espermatozoides.

O aumento do pH durante o resfriamento também pode estar relacionado ao percentual de espermatozoides vivos durante o armazenamento. A temperatura de armazenamento reduzida diminui a taxa metabólica, retarda as reações químicas e retarda o crescimento de bactérias, resultando em uma extensão da vida fértil dos espermatozoides (PICKETT & AMANN, 1987). Com a redução do metabolismo ocasionado pelo resfriamento, observou-se que as amostras com maior motilidade espermática apresentaram menores valores de pH. Isso pode estar relacionado a produção de íons hidrogênio e ácido lático provenientes do metabolismo espermático que ocasionam a redução do pH do meio.

CONCLUSÕES

A motilidade progressiva, pH, a integridade de membrana e atividade mitocondrial do sêmen equino pré-resfriamento em diluente a base de leite em pó desnatado não foram influenciadas pelas diluições 1+1; 1+2 ou 1+3. Porém, a diluição 1+3 no resfriamento do sêmen a 15°C proporcionou melhor viabilidade dos espermatozoides equinos e o pH mais estável durante as 48h de resfriamento. A diluição

1+1 em diluente a base de leite em pó desnatado não deve ser utilizada para o resfriamento com esse diluente. O aumento da diluição não interfere na atividade mitocondrial e favorece a viabilidade espermática. O resfriamento do sêmen promove aumento no pH do sêmen diluído.

REFERÊNCIAS

AURICH, J.E.; AURICH, C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41, p.275–279, 2006.

AZIZ, D.M.; AHLWEDE L.; ENBERGS H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology*, v.64, p.1350–1356, 2005.

BALL, B.A. Evaluation and use of transported equine semen. In: *Proceedings of the Equine Assisted Reproductive Technology Workshop*, Davis, p.18-24, 1998.

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.1641–55, 2000.

GÖTZE, R. Besamung und unfruchtbarkeit der haussäugetiere. *Scharper Verlag*, Hannover, 1949.

HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P.; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. *Theriogenology*, v.75, p.849–56, 2011.

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

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.1217–27, 1997.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, p.327, 1975.

KLUG, E.; SIEME, H. *Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis*. Verlag M. & H. Alfeld, 5° völlig überarbeitete Auflage, Hannover, 2003.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, v.32, p.163-167, 2000.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*, San Diego, v.47, p.229-231, 2001.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. *Theriogenology*, v.50, p.833–839, 1998.

NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M.H.; GONZALEZ, E.; AGÜERRO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrology*, v.32, p.351–355, 2000.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-base extender for storage equine semen at 5°C. *Theriogenology*, v.66, p.1115-1122, 2006.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, p.289-302, 1987.

PRICE, S.; AURICH, J.; DAVIES-MOREL, M.; AURICH, C. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion semen stored at 5 and 15 degrees C. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.261– 266, 2008.

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.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory*, p.1-38, bulletin 9, 1999.

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.

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

4 CAPÍTULO 2

Bicarbonato de sódio em diluente a base de leite em pó é deletério a viabilidade espermática

Janislene Mach Trentin, Murilo Farias Rodrigues, Luiz Augusto Centeno, Thainá Minela, Mariani Fiorenza, Gilson Antonio Pessoa, Karen Roehe, Carlos Antonio Mondino Silva, Mara Iolanda Batistella Rubin

1. Resumo

O efeito de diluentes com e sem tampão foi avaliado sobre a viabilidade de espermatozoides a fresco e resfriados a 5°C durante 24 e 48h. Os diluentes testados continham leite desnatado (em pó) com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou não continham nenhum tampão (C). Os ejaculados de 7 pôneis (três ejaculados/pônei) foram centrifugados a 450 g por 10 minutos para remoção do plasma seminal após diluição. Logo após os espermatozoides foram ressuspensos através de diluição até a concentração 50×10^6 spz/mL com os diluentes A, B ou C. Imediatamente após a diluição a motilidade progressiva (MP) dos espermatozoides foi avaliada não havendo diferença na MP entre todos os diluentes ($P > 0,05$). As 24 e 48h após o resfriamento a 5°C a MP foi avaliada, respectivamente, para o diluente A (44,76%; 25,23%), B (51,42%; 38,09%) e C (54,05%; 41,66%). A integridade da membrana plasmática foi similar após a exposição aos três diluentes. A fresco, a atividade mitocondrial foi maior ($P < 0,05$) no sêmen exposto ao diluente A (A=1,05nm, B=0,81nm, C=0,79nm) e após 24h de resfriamento nos diluentes A e B a atividade foi similar (0,83nm; 0,73nm), enquanto que no diluente C observou-se menor atividade mitocondrial (0,64nm). Nas 48h, os três diluentes se comportaram de forma semelhante (A=0,72; B=0,69; C=0,63; $P > 0,05$). O pH do diluente e sua osmolaridade assim como o pH do sêmen diluído foi maior no diluente A (8; 382; 7,9), intermediário (7,5; 362; 7,32) no B e menor no C (7,16; 350; 7,07). A peroxidação lipídica e a indução da peroxidação foram similares em todos os grupos. O bicarbonato de sódio (A) é prejudicial a motilidade e aumenta o pH do sêmen. O diluente sem tampão foi considerado o mais apropriado para uso imediato na IA. Tanto o diluente com HEPES como o diluente sem tampão foram considerados adequados para o resfriamento do sêmen equino a 5°C durante 48h.

Palavras-chave: espermatozoides, bicarbonato de sódio, HEPES, pH, resfriamento.

2. Abstract

The effect of buffered and non buffered semen extenders was evaluated considering the maintenance of sperm viability before and after cooling at 5°C during 24 and 48h. A non-buffered milk powder extender (C = control) and the same extender buffered with sodium bicarbonate (A) and HEPES (B) were used. After dilution, semen

from seven ponies was centrifuged at 450 g for 10 minutes and seminal plasma discharged. Thereafter, sperm was diluted to a concentration of 50×10^6 cells/mL with extenders A, B or C. Immediately after dilution sperm motility was evaluated and progressive motility was similar on all extenders ($P > 0.05$). At 24 and 48h after cooling at 5°C sperm motility was evaluated, respectively, for extender A (44.76%; 25.23%), B (51.42%; 38.09%) and C (54.05%; 41.66%). Plasma membrane integrity was similar after exposure to the three extenders. Mitochondrial activity after dilution was higher in extender A (A= 1.05nm, B= 0.81nm, C= 0.79nm) and after cooling for 24h was 0.83nm (A), 0.73nm (B) and 0.64nm (C). After 48h mitochondrial activity decreased to 0.72nm (A), 0.69nm (B) and 0.63nm (C) ($P > 0.05$). The extenders pH, osmolarity and pH of diluted semen were higher in extender A (8; 382; 7.9), intermediate in extender B (7.5; 362; 7.32) and lower in extender C (7.16; 350; 7.07). Lipid peroxidation and its induction were similar on all groups. Sodium bicarbonate (A) reduces progressive motility and increases semen pH. The non buffered (C) semen extender was considered more appropriate for semen dilution for immediate use in AI. The non-buffered (C) and HEPES buffered (B) semen extenders were considered appropriate for cooling equine semen during 48h at 5°C .

Keywords: sperm, sodium bicarbonate, HEPES, pH, cooling.

3. Introdução

A técnica do resfriamento do sêmen equino tem sido estudada para a manutenção do potencial fertilizante do sêmen durante um período prolongado (BATELLIER et al., 2001). O diluente mais comumente utilizado para o resfriamento do sêmen equino tem como base o leite desnatado (KENNEY et al., 1975). Esses diluentes são conhecidos por sua praticidade e pela proteção que conferem aos espermatozoides durante o resfriamento (AURICH, 2008), mas a longevidade dos espermatozoides parece variar de acordo com a composição do diluente.

A temperatura de armazenamento, a taxa de resfriamento, a exposição ao oxigênio, a presença de bactérias, a presença e o tipo de antibióticos adicionados ao diluente, bem como a concentração de plasma seminal durante o resfriamento também influenciam a viabilidade espermática. Além da preservação da motilidade, devem ser preservados pelos diluentes a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides, as suas mitocôndrias e a cromatina espermática. Isso é alcançado pela adição de substâncias aos diluentes de sêmen que devem preencher, pelo menos, os seguintes requisitos: osmolaridade semelhante ou ligeiramente superior a do sêmen (300-350 mOsm/L), pH levemente ácido (6,8) para neutro (7,0); componentes que

estabilizem o pH e controlem o crescimento de microrganismos; devem ter uma fonte de energia facilmente disponível, propriedades que asseguram a estabilização de membranas e a função metabólica dos espermatozoides, que proporcionam a neutralização de substâncias metabólicas, e, finalmente, não devem interferir com os resultados da avaliação do sêmen (AURICH, 2011).

Como resultado do metabolismo espermático, grandes quantidades de catabólitos acarretam aumento do ácido láctico no meio extracelular. Este acúmulo pode causar a morte dos espermatozoides devido às drásticas alterações do pH, justificando a necessidade de adição de tampões ao diluente (HOLT, 2000). Como tampão, o bicarbonato de sódio foi utilizado por Kenney et al., (1975). Posteriormente, o HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico), um tampão orgânico que mantém o pH com maior eficiência e constância que o uso único de bicarbonato de sódio, foi objeto de estudos na década de 60 no meio de maturação na produção de embriões (GOOD et al., 1966; DOWNS & MASTROPOLO, 1997) e seu uso é indicado até a presente data.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do diluente de sêmen equino com leite desnatado (em pó) sem tampão e tamponado com Bicarbonato de Sódio ou HEPES sobre a viabilidade espermática e o pH do sêmen diluído a fresco ou resfriado a 5°C durante 24 e 48 h.

4. Material e Métodos:

4.1 Local do experimento e animais

O estudo foi realizado no Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab) localizado na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, Brasil, de outubro a novembro de 2013. Três ejaculados por pônei foram obtidos de sete pôneis da raça Brasileira com idade de 9 a 13 anos. O sêmen de todos os garanhões foi rotineiramente coletado através de vagina artificial modelo Hannover, duas vezes por semana antes e durante o experimento.

4.2 Coleta e diluição do sêmen

Após a coleta, o sêmen foi filtrado com gaze estéril e analisado macroscopicamente quanto ao volume, coloração e aspecto. A avaliação da concentração espermática foi efetuada em câmara de Neubauer. O volume total do ejaculado foi dividido em três frações e diluído a 1:1 (sêmen:diluyente) com três diferentes diluentes (Tabela 1) e centrifugado a 450g por 10 minutos para remoção do plasma seminal. Removido o sobrenadante, o pellet foi ressuspendido no respectivo diluyente e a concentração foi ajustada para 50×10^6 spz/mL. Exceto onde citado, os componentes químicos são procedentes da Sigma Aldrich (St Louis, MO, EUA).

Na sequência, uma amostra de cada grupo foi utilizada para análise da motilidade, pH, hiposmótico, atividade mitocondrial (MTT), peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e indução da peroxidação através do sulfato de ferro. Uma amostra de cada diluyente foi utilizada para avaliação do pH, osmolaridade, MTT, TBARS e indução da peroxidação através do sulfato de ferro. O restante foi mantido resfriado a 5°C em geladeira. Novas avaliações foram efetuadas em 24h e 48h de resfriamento. As avaliações foram conduzidas após 15 minutos de aquecimento das amostras em mesa térmica ajustada a 37°C.

Tabela 1. Composição química de soluções diluentes com distintos tampões testadas em sêmen de pôneis da raça Brasileira.

<i>Diluyente / Componente</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
Leite em pó desnatado	2,4g	2,4g	2,4g
Glicose	4,9g	4,9g	4,9g
Bicarbonato de Sódio	0,150g	-	-
HEPES	-	0,100g	-

4.3 Avaliação do sêmen

A avaliação da motilidade espermática foi efetuada de acordo com Varner (1989) através da determinação percentual de espermatozoides móveis no ejaculado e a caracterização do tipo de movimento.

4.3.1 Teste de funcionalidade de membrana (HOST)

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico, na proporção 2:1 (água destilada:sêmen), perfazendo a osmolaridade estimada de 100mOsm/Kg H₂O⁻¹. As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, de acordo com o protocolo de Lomeo & Giambérsio (1991) e adaptado para equinos por Lagares et al. (2000). Posteriormente, a análise foi conduzida sob microscópio de contraste de fase (400x), sob lâmina e lamínula contando 100 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides íntegros são aqueles que sofrem um enrolamento de cauda e desta forma foram avaliados.

4.3.2 Atividade mitocondrial através da redução do Tetrazolium (MTT):

O ensaio de redução de MTT depende da capacidade das células metabolicamente ativas em reduzir o sal tetrazólico (3 [4,5-dimetiltiazol-2-y1] -2,5-difeniltetrazólio) a formazan (AZIZ et al., 2005). O MTT é um sal amarelo que, sob a ação de desidrogenases de células metabolicamente ativas, é reduzido a formazan, com a formação de cristais de coloração roxa insolúveis em água. Estes cristais podem ser solubilizados com solventes orgânicos e a intensidade de cor púrpura, medida espectrofotometricamente, mostra a relação direta entre a quantidade de células vivas e metabolicamente ativas nas amostras.

Para a determinação da atividade mitocondrial, uma alíquota de cada amostra foi centrifugada a 600xg por 10 minutos para obtenção de concentração de 100x10⁶ sptz/mL. O pellet foi ressuspensionado com o diluente conforme a amostra e o sobrenadante foi descartado. Duas alíquotas de 200 µL da amostra com 100x10⁶sptz/mL foram depositadas em tubos de microcentrífuga de 2mL. Após, 20µL da solução de Tetrazolium (5mg/mL em PBS salino) foi adicionado em cada alíquota incubando por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após o tempo de incubação foi adicionado 200 µL de solução de 0,04N de HCl em Isopropanol. Em seguida, cada alíquota foi centrifugada a 1200xg por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade metabólica mitocondrial em espectrofotometria de luz visível com 540nm de comprimento de onda, considerando o branco a solução de diluente + MTT + 0,04N

HCl-isopropanol. As alíquotas de cada garanhão e as alíquotas dos brancos dos diluentes foram analisadas em triplicatas.

4.3.3 Teste de lipoperoxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Uma amostra com 10×10^6 espermatozoides ajustada a $80 \mu\text{L}$ serviu para realização do teste de lipoperoxidação lipídica através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

A dosagem da concentração de TBARS nas amostras de sêmen foi determinada em tubo de microcentrifugas onde foi depositado 0,2 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA), 0,2 mL de solução de ácido acético, 0,04 mL de água ultra-pura, 0,08 mL da amostra e 0,08 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS). Os tubos contendo esta mistura foram incubados a 100°C por 2h e em seguida, resfriados em recipiente com gelo. Após, as amostras foram centrifugadas a $8000 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante foi utilizado para leitura da absorbância em espectrofotômetro. O ensaio foi realizado em triplicata e a absorbância das amostras foi determinada com filtro 532nm. Amostras dos diluentes consideradas como brancos também foram avaliadas. Todas as análises foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Perkin Elmer - Lambda 25) a 25°C no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Maria.

4.3.4 Indução da Peroxidação Lipídica através do Sulfato de Ferro

Para induzir a lipoperoxidação, uma segunda amostra (10×10^6 espermatozoides ajustada a $80 \mu\text{L}$) foi adicionada a 0,02 mL de sulfato ferroso e 0,02 mL de ácido ascórbico e essas amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 1h. Após, a cada amostra adicionou-se 0,2 mL de ácido tricloroacético. As amostras foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e depositado em tubos de microcentrífuga aos quais acrescentou-se 0,2 mL do reagente TBA (ácido tiobarbitúrico). As amostras permaneceram incubadas a 100°C por 1h e foram resfriadas para centrifugação procedendo-se em cada amostra o mesmo protocolo da mensuração de TBARS. Este procedimento é conhecido como lipoperoxidação induzida ou

catalisada por ferro e tem por objetivo medir todo o potencial que a amostra teria de gerar o radical em questão que está relacionado a peroxidação lipídica.

4.4 Análise Estatística

O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi feita através do Teste de Duncan. O software Graph Prism foi utilizado para preparar os gráficos.

5. Resultados:

5.1 Motilidade Progressiva

A motilidade progressiva do sêmen diluído a fresco foi similar nos diluentes A, B ou C (Figura 1). Nas 24 e 48h de resfriamento, o diluente A (com bicarbonato de sódio) apresentou menor percentual de espermatozoides com motilidade progressiva comparado aos diluentes B e C que apresentaram, entre si, valores superiores e semelhantes ($P = 0,278$).

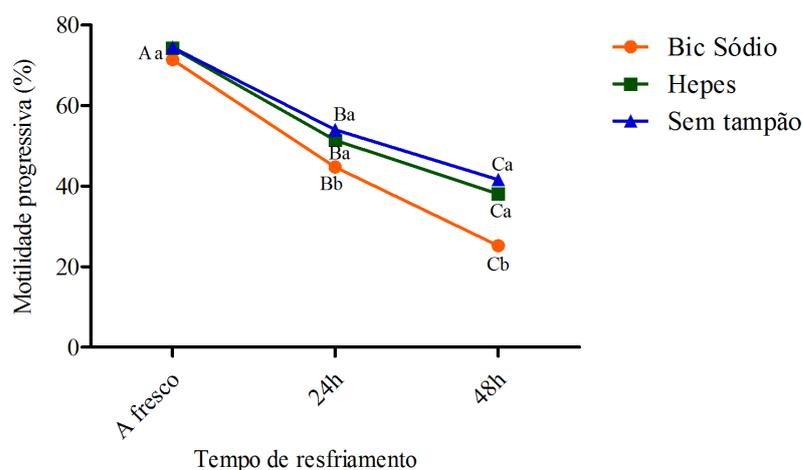


Figura 1. Médias da motilidade espermática progressiva do sêmen de pôneis da raça Brasileira resfriado a 5°C por 48h em diluentes com bicarbonato de sódio (A), B (HEPES) ou sem tampão (C) ($P = 0.0278$).

5.2 Integridade de Membrana

A integridade de membrana espermática (HOST) foi similar ($P > 0.05$) entre os diluentes A, B e C a fresco e nas 24 e 48h de resfriamento (Figura 2).

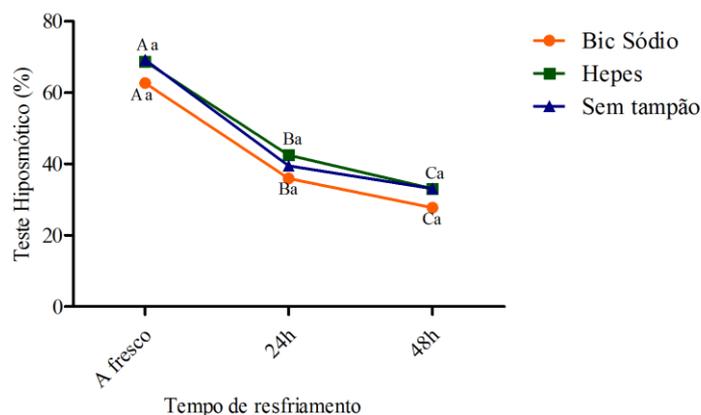


Figura 2. Médias do percentual de espermatozoides de pôneis da raça Brasileira reagentes ao Teste Hiposmótico, resfriados a 5°C em diluentes com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), por 48h ($P > 0.05$).

5.3 Atividade mitocondrial

A maior atividade mitocondrial a fresco foi obtida com o diluente A e menor atividade para os diluentes B e C (Figura 3). Nas 24h de resfriamento, os diluentes A e B foram semelhantes, sendo que o diluente C resultou em menor atividade. A atividade mitocondrial das amostras de sêmen nas 48h de resfriamento foi similar nos três diluentes. A absorbância das soluções brancas revelou que o diluente A apresentou absorbância maior que os demais diluentes (Figura 4).

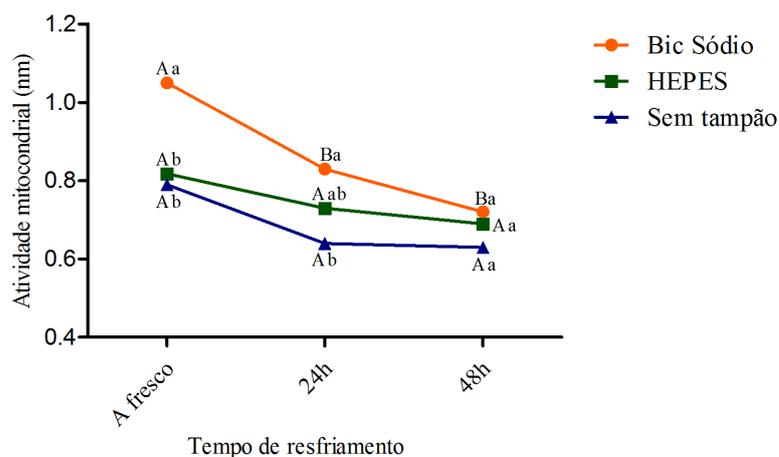


Figura 3. Valores de absorvância da atividade mitocondrial do sêmen de pôneis da raça Brasileira nos diluentes com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), resfriados por 48h a 5°C ($P = 0.002$). Letras minúsculas distintas indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os diluentes, em cada tempo. Letras maiúsculas indicam diferenças ($P < 0,05$) entre os tempos de cada diluente.

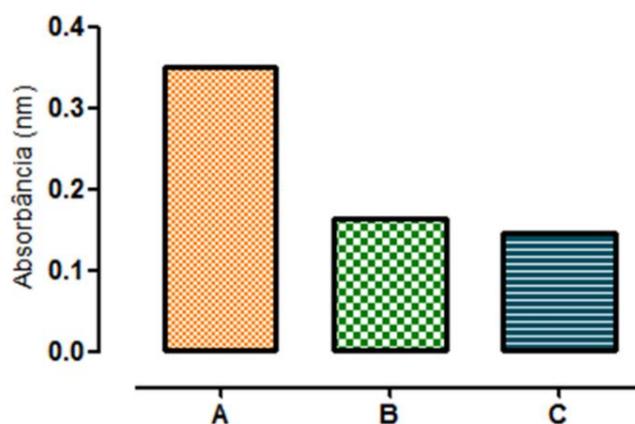


Figura 4. Valores de absorvância de diluentes para sêmen equino com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) e sem tampão (C).

5.4 pH

Ao avaliar o pH detectou-se que o diluente com bicarbonato (A) apresentou o maior valor de pH na hora inicial (0h), nas 24h, bem como nas 48h de resfriamento. Valores intermediários de pH foram observados no diluente B. Os menores valores de pH observou-se no diluente C, que manteve-se estável até 48h de resfriamento (Figura 5).

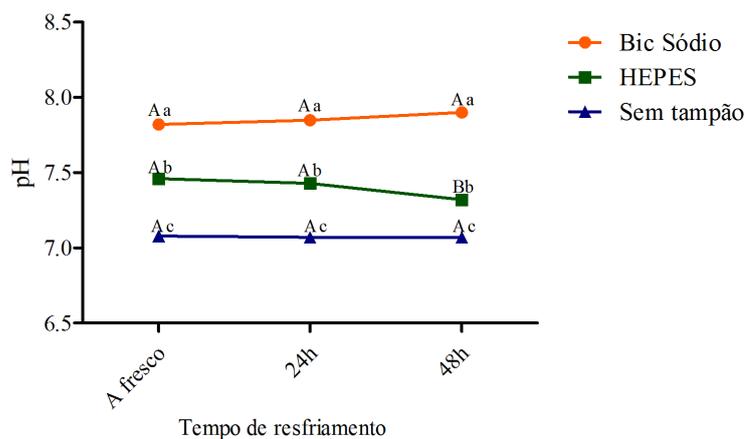


Figura 5. Valores de pH do sêmen diluído de pôneis da raça Brasileira em diluente com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), a fresco e refrigerado a 5°C por 48h ($P = 0.0278$).

O pH dos diluentes (Figura 6) avaliados logo após o preparo, nas 24h e 48h de resfriamento se comportou semelhante ao pH do sêmen diluído com os mesmos diluentes (diluente A= com maior valor de pH; diluente B= pH intermediário e diluente C= menor valor de pH).

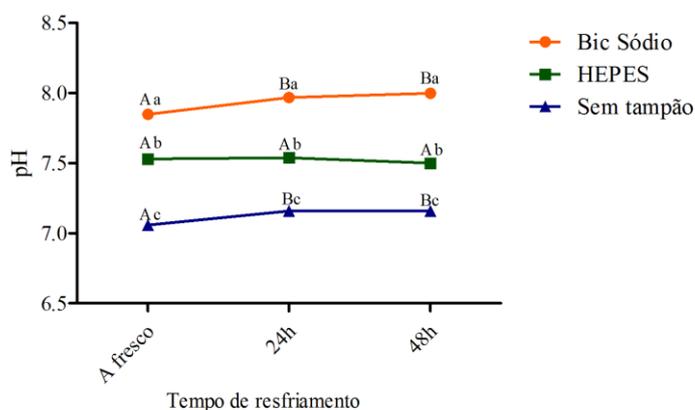


Figura 6. Valores médios do pH dos diluentes A, B e C para sêmen equino a fresco (0h) e nas 24h e 48h de resfriamento ($P = 0.0278$).

5.5 Osmolaridade dos diluentes

Os resultados indicaram maior osmolaridade do diluente A, osmolaridade intermediária do diluente B e menor osmolaridade do C (Figura 7).

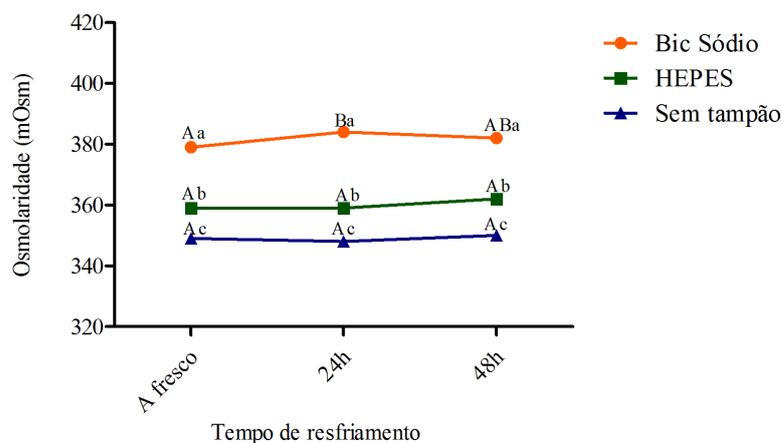


Figura 7. Valores médios de osmolaridade dos diluentes com bicarbonato de sódio (A), HEPES (B) ou sem tampão (C), a fresco (0h) e refrigerados a 5°C por 48h (P = 0.002).

5.6 Lipoperoxidação e Indução da peroxidação através do sulfato ferroso

Ao avaliar a lipoperoxidação e a indução da peroxidação, observou-se similaridade entre os diluentes A, B e C em ambos testes.

6 Discussão:

Os diluentes B (HEPES) e C (sem tampão) apresentaram resultados superiores ao A (bicarbonato de sódio) em todas as avaliações, exceto quanto a atividade mitocondrial a fresco. Isso pode ser explicado pelo fato de que a hiperativação espermática ocorre espontaneamente na maioria dos espermatozoides incubados em meios que contêm bicarbonato (NEIL & OLDS-CLARKE, 1987) e Ca^{2+} (CHRISTENSEN et al., 1996).

Rathi et al. (2001) demonstraram que na ausência de bicarbonato de sódio, os espermatozoides não perdem sua integridade de membrana e a capacitação espermática é mínima, porém, quando expostos ao bicarbonato de sódio, o espermatozoide se torna vulnerável a ruptura de membrana e a morte celular. Ainda, o bicarbonato de sódio leva a modificações na estrutura dos lipídios da membrana plasmática dos espermatozoides equinos (GADELLA & HARRISON, 2000). Rathi et al. (2001) observaram moderada indução da reação de acrossoma quando espermatozoides foram incubados em meio com bicarbonato de sódio; na ausência de bicarbonato a reação de acrossoma não foi observada.

A sugestão é de que o bicarbonato de sódio ativa a adenilato-ciclase, diretamente ou indiretamente, causando influxo de Ca^{2+} (CHRISTENSEN et al., 1996), e, assim, elevando as concentrações intracelulares de AMPc, o que, por sua vez, induz a hiperativação dos espermatozoides (WHITE & AITKEN, 1989). Essa hiperativação dos espermatozoides pode estar associada ao aumento na degradação do sal tetrazólico o que explicaria o porquê do diluente com bicarbonato de sódio ter expresso o maior valor de atividade mitocondrial a fresco. Após o resfriamento e acompanhando o declínio da motilidade, a atividade mitocondrial do diluente A também decaiu, ficando nas 48h de resfriamento semelhante aos outros diluentes.

Pela avaliação da motilidade verificou-se que não houve diferença entre o efeito do diluente com a adição do tampão HEPES (B) e sem a adição de tampão (C). Isso sugere que a adição desse tampão não comprometeu a motilidade dos espermatozoides a 5°C, porém sua adição não se mostrou necessária.

O pH do ejaculado equino varia entre 6,8 e 7 porém pode ser influenciado por diversos fatores. Os diluentes devem ter um efeito tampão sobre o pH do sêmen diluído para equilibrar a produção de substâncias metabólicas dos espermatozoides ou bactérias contaminantes (AURICH, 2011). Aqui, a adição de tampões ao diluente fez com que o valor do pH se alterasse. Quando se avaliou o pH somente dos diluentes durante 48h de resfriamento verificou-se que o diluente B teve a menor variação entre 0 e 48h, mas no diluente C observou-se valores mais próximos ao fisiológico. Ressalta-se aqui que a necessidade de se adicionar um tampão ao sêmen deve ser analisada criteriosamente, já que a ausência do tampão no diluente não prejudicou a integridade de membrana e a motilidade dos espermatozoides. E mais, a adição de tampões aos diluentes fez com que o pH do meio se elevasse, tanto com o bicarbonato de sódio quanto com o HEPES.

O uso de diluente a base de leite em pó desnatado pode ter conferido capacidade antioxidante ao sêmen diluído, o que explicaria a similaridade entre os diluentes quanto a peroxidação lipídica, já que os três diluentes possuem a mesma quantidade de leite desnatado. Já foi citado por Kankofer et al. (2005) que a diluição do sêmen somente com diluente a base de leite resulta em um aumento significativo na capacidade antioxidante do sêmen diluído.

7 Conclusões:

Conclui-se através da análise da viabilidade espermática que o sêmen diluído em diluente com leite em pó desnatado e tampão HEPES, ou sem tampão apresenta qualidade superior ao diluído com o mesmo diluente tamponado com bicarbonato de sódio. A adição de bicarbonato de sódio diminui a motilidade progressiva levando ao incremento do pH. Para o uso imediato na IA não há necessidade de se tamponar o diluente a base de leite desnatado. O diluente com HEPES, bem como o diluente sem tampão é considerado adequado para o resfriamento do sêmen equino durante 48h a 5°C. A adição de tampões resulta no aumento do pH dos diluentes. Porém, o uso de tampão não é necessário quando se utilizar diluente a base de leite em pó desnatado e glicose por 48h de resfriamento.

8 Referências:

Aurich, C., 2008. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, 107, 268–275.

Aurich, C., 2011. Semen Extenders for Cooled Semen (Europe). In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed), *Equine reproduction*, vol 1, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom, 131, 1336-1340.

Aziz, D.M., Ahlswede L., Enbergs H., 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology*, 64, 1350–1356.

Batellier, F., Vidament, M., Fauquant, J., Duchamp, G., Arnaud, G., Yvon, J.M., Magistrini, M, 2001. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, 68, 181-190.

Christensen, P., Whitfield, C.H., Parkinson, T.J., 1996. In Vitro induction of acrosome reaction in stallion spermatozoa by heparin and A23187. *Theriogenology*, 45, 1201-1210.

Downs, S.M., Mastropolo, A.M, 1997. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte. *Molecular Reproduction and Development*, 46, 551-566.

Gadella, B.M., Harrison, R.A.P., 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the plasma membrane. *Development*, 127, 2407-2420.

Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., Singh, R.M.M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry*, 5, 2, 467-477.

Holt, W.V., 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62, 3-22.

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J.E., Aurich, C., 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, 63:1354–65.

Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L., Morse, G.W., 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: *Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 327.

Lagares, M.A., Petzoldt, R., Sieme, H., Klug, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, 32, 163-167, 2000.

Lomeo, A.M.; Giambersio, A.M., 1991. Water test: A sample methods to asses sperm membrane integrity. *International Journal of Andrology*, 14, 278-282.

Neill J.M., Olds-Clarke P., 1987. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Research*, 18:2, 121-140

Rathi, R., Colenbrander, B., Bevers, M.M., Gadella, B.M., 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65, 462-470.

Varner, D.D., Blanchard, T.L., Meyers, P.J., Meyers, S.A., 1989. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. *Theriogenology*, 32, 515-525.

White, D.R., Aitken, R.J., 1989. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete Research*, 22, 163-177

5 COMITE DE ÉTICA

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria cujo parecer possui registro nº065/2013.

6 CONCLUSÕES

As três diluições testadas no sêmen fresco não influenciaram a motilidade progressiva, pH, integridade de membrana e atividade mitocondrial. Porém, a diluição 1+3 a 15°C proporciona melhor viabilidade dos espermatozoides equinos e o pH mais estável durante 48 horas de resfriamento. O aumento da diluição não interfere na atividade mitocondrial e favorece a viabilidade espermática. O resfriamento do sêmen promove aumento no pH do sêmen diluído. A diluição 1+1 não deve ser utilizada para o resfriamento.

A análise da viabilidade espermática permite concluir que o sêmen diluído em diluente a base de leite desnatado com tampão HEPES ou sem tampão apresenta qualidade superior ao diluído com o mesmo diluente tamponado com bicarbonato de sódio. A adição de bicarbonato de sódio diminui a motilidade progressiva levando ao incremento do pH. Com isso, não se recomenda utilizar bicarbonato para tamponar o pH do diluente de sêmen. Para o uso imediato na IA não há necessidade de se tamponar o diluente a base de leite desnatado. Assim, considera-se que tanto o diluente com HEPES, quanto o diluente sem tampão são adequados para o resfriamento do sêmen equino por 48h a 5°C. A adição de tampões resulta no aumento do pH dos diluentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v.6, p.19–24, 1994.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.581–588, 2004.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145–173, 1987.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. **Spermatozoal function**. In: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1993.

AMANN, R.P.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v.25 p.317–25, 2004.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES JD. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.145-151, 2011.

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

AURICH, C.; SEEBER, P.; MULLER-SCHLOSSER, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5 degrees C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.445–8, 2007.

AURICH, C.; SPERGSEER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.912–918, 2007.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268–275, 2008.

AURICH, C. **Semen Extenders for Cooled Semen (Europe)**. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed), Equine reproduction, vol 1, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom, cap.131, p.1336-1340, 2011.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBE, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v.56, p.577-89, 2001.

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

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, 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.

BEDFORD, S.; VARNER, D.; MEYERS, S. Effects of cryopreservation on the acrossomal status of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction Fertility, Supplement**, n.56, p.133-140, 2000.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; HURTGEN, J.P.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, R.M. Use of a semen extender containing antibiotics improve fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**, v.28, n.4, p. 541-546, 1987.

BOE-HANSEN, G.B.; ERSBOLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.2006-2019, 2005.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. **Artificial Insemination**. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. (Eds.). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea &Febiger, p.790-797, 1992.

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, 1999.

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. **Semen Extenders for Cooled Semen (North America)**. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed), *Equine reproduction*, vol 1, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom, cap.132, p.1341-1342, 2011.

BROUWERS, J.F.; 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.

CAMPBELL, R.C.; DOTT, H.M.; GLOVER, T.D. Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. **Journal of Agricultural Science**, v.48, p.1–8, 1956.

CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v.58, p.1587–95, 2002.

COCCHIA, N.; PASOLINI, M.P.; MANCINI, R.; PETRAZUOLLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1201-1210, 2011.

CRESPILHO, A.M.; A, SPIZZIRI, B.E; MEYERS, B.M.; GRAHAM, J.K. The Effect of Cholesterol Addition, Buffer, and pH on Equine Sperm Stored at 5°C. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.663-666, 2013.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.7–11, 1998.

DARENIUS A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: Stallion Reproduction Symposium, **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, Montgomery, AL: Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners, p.60-70, 1998.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v.89, p.271-277, 1986.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v.13, p.379–386, 1992.

DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M. A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.189-191, 2002.

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

DOWNS, S.M., MASTROPOLO, A.M. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.551-566, 1997.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live and dead stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p.443–446, 1972.

DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v.42, p.136 –56, 2008.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. **The spermatozoon**. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, p.29–77, 1994.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored a 10°C. **Theriogenology**, v.63, p.1605-1616, 2005.

FUSE, H.; OHTA, S.; SAKAMOTO, M.; KAZANA, T.; KATAYAMA, T. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. **Archives of Andrology**, v.30, p.111-116, 1993.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT,T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249–265, 2001.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v.34, p.127–138, 1986.

GAVELLA, M., LIPOVAC, V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of in infertile men. **Archives of Andrology**, v.28, p.135–141, 1992.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. **Espermatozoide e plasma seminal**. In: Hafez ESE. *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri: Manole, p.97-110, 2004.

GOOD, N.E.; WINGET, G.D.; WINTER, W.; CONOLLY, T.N.; IZAWA, S.I.; SINGH, R.M.N. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v.5, n.2, p.467-477, 1966.

GRAHAM, J.K. **Principles of cooled semen**. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed), *Equine reproduction*, vol 1, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom, cap.127, p.1308-1315, 2011.

HANCOCK, J.L. A staining technique for the study of temperature shock in semen. **Nature**, v.167, p.323, 1951.

HARKEMA, W., BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. **Congress proceedings 12th International Congress on Animal Reproduction**, v.3, p.1424–1426, 1992.

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.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

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

JASKO, D.F.; FARLIN, M.E.; HUTCHINSON, H.; MORAN, D.M.; SQUIRES, E.; BURNS, P.J. Progesterone and estradiol in biodegradable microspheres for control of estrus and ovulation in mares. **Theriogenology**, v.40, p.465–78, 1993.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.I.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-225, 1984.

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.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion sperm. **Theriogenology**, v.48, n.7, p.1217–1227, 1997.

KATILA, T. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.2, 2001.

KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.58, p.241–4, 2002.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v.21, p.327-336, 1975.

KODAMA, H.; KURBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v.17, p.151–157, 1996.

KOSNIAK, K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23 (Suppl.), p.59–61, 1975.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v.165, p.1–10, 1998.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v.32, p.163-167, 2000.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **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. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v.57, p.1135–42, 2002.

MALMGREN, L.; DEN KAMP, B.O.; WÖCKENER, A.; BOYLE, M.; COLENBRANDER, B. Motility, velocity and acrosome integrity of equine spermatozoa stored under different conditions. **Reproduction of Domestic Animals**, v.29, p.469–476. 1994.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

MANN, T.; MINOTAKIS, C.S.; POLGE, C. Semen composition and metabolism in the stallion and jackass. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.5, p.109–22, 1963.

MARSHBURN, P.B.; MCINTIRE, D.; CARR, B.R.; BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, v.58, p.179-86, 1992.

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.

NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA E SILVA, E.V.; ZUCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434–439, 2008.

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components of egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v.39, p.1144–9, 1974.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-base extender for storage equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v.66, p.1115–1122, 2006.

PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. **Journal of Dairy Science**, v.23, p.399–404, 1940.

PRICE, S.; AURICH, J.; DAVIES-MOREL, M.; AURICH, C. Effects of oxygen exposure and gentamicin on stallion sêmen stored at 5 °C and 15 °C. **Reproduction of Domestic Animals**, v.43, p.261–266, 2008.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL, G.E.; BERNDTSON, W.E; VOSS, J.L. Reproductive physiology of stallion VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**, v.43, p.617–625, 1976.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.289–302, 1987.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; BOWEN, R.A.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A.O. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. **Proceedings of American Association of Equine Practitioners**, v.33, p.487–518, 1987.

PICKETT B.W., SHINER K.A. Recent developments in artificial insemination in horses. **Livestock Production Science**, v.40, p.31–36, 1994.

POMMER, A.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, v.58, p.1373–84, 2002.

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

RASUL, Z.; ANZAR, M.; JALALI, S.; AHMAD, N. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.59, p.31–41, 2000.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPENA, A.C.; PEREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENA, J.; LOPEZ-PEREZ, M.J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activity. **Clinical Chemistry**, v.44, p.1616–1620, 1998.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. The relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v.44, p.107–11, 1991.

SAMPER, J.C. **Artificial insemination**. In: Samper JC (ed.) *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*, 2nd edition. St. Louis: Saunders, p.165–74, 2009.

SLATER, T.F.; SAWYER, B.; STRÁIULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.77, p.383, 1963.

SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion, **Animal Reproduction Science** v.107, p.276–292, 2008.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, p.1-38. (Bulletin, 9), 1999.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.203–213, 1997.

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 Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p.505-514, 1999.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709–18, 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.1043–54, 1988.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24h at 5 or 20°C. **Theriogenology** v.32, p.515–525, 1989.

VARNER, D.D. Composition of seminal extenders and its effect on motility of equine spermatozoa. **Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology**, p.146–150, 1991.

VARNER, D.D. Technical considerations for cooltransported equine semen. In: 9° Congresso Nazionale Multisala Sive, Pisa. **Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians**, p.7, 2003.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p448-662, 2008.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; GARCIA, A.C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.

WATSON, P.F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. **Journal of Thermal Biology**, v.1, p.137–41, 1976.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

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

YANAGIMACHI, R. **Mammalian fertilization**. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, p.189–317, 1994.

YÁNIZ, J.L.; MATEOS, J.A.; SANTOLARIA, P. *Zwitterionic* buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. **Small Ruminant Research**, v.95, p.54-60, 2011.