

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes  
para sêmen equino refrigerado**

Autor: Fabiana Santos Castro

Orientador: Prof. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner

Porto Alegre  
2014

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

## **Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal, sob a orientação da Dra. Sandra Mara Fiala Rechsteiner

PORTO ALEGRE  
2014

### CIP - Catalogação na Publicação

Santos Castro, Fabiana

Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado / Fabiana Santos Castro. -- 2014.

36 f.

Orientador: Sandra Fiala Rechsteiner.

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. garanhão. 2. refrigeração. 3. sêmen. 4. leite UHT. 5. diluente. I. Fiala Rechsteiner, Sandra, orient. II. Título.

## **Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal, sob a orientação do Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner.

### **APROVADO POR:**

---

Profa. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner  
Orientador

---

Dra. Anita Mylius Pimentel  
Membro da Comissão

---

Dr. Ivan Bustamante Filho  
Membro da Comissão

---

Dr. Gabriel Ribas Pereira  
Membro da Comissão

Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso.  
Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los.  
Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de  
orgulho.  
(Dalai Lama)

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Dra. Sandra Fiala Rechsteiner, pela paciência e ajuda.

Ao professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, pelo apoio e que colocou a disposição o Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) para realização do experimento.

A professora Dra. Maria Inês Jobim, pela colaboração e apoio.

Aos colegas estagiários e da pós-graduação do Reprolab para a realização dos experimentos, na realização do trabalho.

A Dra. Anita Mylius Pimentel pela ajuda nas correções, meu muito obrigado.

Aos meus amigos pela compreensão e entender as minhas ausências.

A minha família pelo apoio nos momentos difíceis.

## RESUMO

### Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado

Autor: Fabiana Santos Castro  
Orientador: Sandra Fiala Rechsteiner

Dois experimentos foram conduzidos para verificar a viabilidade do uso do leite UHT como diluente para sêmen equino refrigerado. O objetivo principal deste estudo foi avaliar o uso de leite UHT nas apresentações desnatado, semidesnatado e integral como diluente de sêmen e posteriormente foi avaliada a viabilidade espermática com o uso de leite como diluente comparado a outros dois diluentes industrializados. No experimento I foram utilizados 31 ejaculados de 3 garanhões, as amostras de cada ejaculado foram diluídas em leite UHT nas apresentações integral, semidesnatado e desnatado, numa proporção de 3:1 (3 ml de diluente e 1ml de sêmen). Foram realizadas análises de viabilidade espermática com testes de motilidade espermática, vigor espermático, integridade de membrana (CFDA/PI) e funcionalidade de membrana espermática (HOST) pós-diluição, os quais foram repetidos nas amostras refrigeradas a 4°C após 24 e 48h. Neste experimento, não foram observadas diferenças significativas entre os 3 diluentes, quanto a motilidade espermática, vigor, CFDA/PI e HOST. No entanto, houve uma diminuição na qualidade do sêmen armazenado por 48h ( $P < 0,01$ ), sendo mais acentuada entre 24 e 48h de refrigeração. No experimento II foram utilizados 30 ejaculados de 3 garanhões onde, logo após a coleta do sêmen, as amostras de cada ejaculado foram diluídas com leite UHT desnatado (LD), Botusemen<sup>®</sup> (BS) e Botusemen Special<sup>®</sup> (BSP). As amostras foram examinadas a fresco, após a diluição (0h) e em resfriamento de 24h e 48h a 4°C. Foram realizados os mesmos testes de análise espermática do primeiro experimento para avaliação comparativa dos diluentes. As amostras de sêmen refrigeradas com BSP obtiveram maior porcentagem de motilidade total (51,1%) após 24h de refrigeração quando comparado aos outros dois diluentes testados, LD (45,8%) e BS (47,3%). Com base nos resultados obtidos nos dois experimentos, o leite UHT, independente da apresentação, pode ser utilizado como diluente de sêmen para as primeiras 24h de refrigeração, mantendo a viabilidade espermática adequada, sendo também de fácil acesso e manuseio. Se for necessário a manutenção do sêmen por mais de 24h, o BSP se mostrou superior em manter a qualidade do sêmen até 48h.

Palavra-chave: garanhão, refrigeração, sêmen, leite UHT, diluente

## **ABSTRACT**

*Author: Fabiana Santos Castro  
Adviser: Sandra Fiala Rechsteiner*

*Two experiments were conducted to verify the feasibility of the use of UHT milk as an extender for chilled equine semen. The main objective of this study was to evaluate the use of UHT milk in skimmed, semi-skimmed and whole milk as extender for semen and subsequently assess sperm viability using milk as a diluent compared to two other industrial extenders. In the first experiment were used 31 ejaculates from 3 stallions of known fertility, samples of each ejaculate were diluted in the whole UHT milk, semi-skimmed milk and skim milk shows a ratio of 3:1 (3ml diluent and 1ml of semen). Sperm viability analyzes were performed, including sperm motility, sperm vigor, membrane integrity (CFDA/PI) functionality and sperm membrane (HOST) post-dilution tests which were repeated in the samples cooled to 4°C after 24 and 48h. In this experiment, no significant differences in sperm motility, vigor, CFDA/IP and HOST were observed among the 3 extenders. However, there was a decrease in the quality of semen stored for 48h ( $P < 0.01$ ), being more pronounced between 24 and 48h of cooling. In the second experiment, 30 ejaculates from 3 stallions were used soon after collection of semen samples, each ejaculate was diluted with UHT skim milk (LD), Botusemen<sup>®</sup> (BS) and Botusemen Special<sup>®</sup> (BSP). The samples were analyzed fresh, immediately after the dilution (0h) and after cooling for 24h and 48h at 4°C. The same tests of sperm analysis used in the first experiment for comparative evaluation of extenders were performed. Semen samples cooled with BSP obtained the highest percentage of total motility (51.1%) after 24h of cooling when compared to the two other extenders tested, LD (45.8%) and BS (47.3%). Based on the results from the two experiments, UHT milk, regardless of the presentation, can be used as a diluent of semen during the first 24h of cooling maintaining adequate sperm viability and is easy to access and handle. If maintenance of semen for more than 24h is required, the BSP was superior in maintaining the quality of semen until 48h.*

*Keyword: stallion, semen, cooling, UHT milk, extender*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Médias dos parâmetros seminais avaliados a fresco e após diluição em leite UHT desnatado, semidesnatado e integral em 0, 24 e 48h.....	30
<b>Tabela 2</b> Médias dos parâmetros de sêmen equino diluído em leite desnatado UHT, Botusemen <sup>®</sup> e Botusemen Special <sup>®</sup> .....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ATP – adenosina trifosfato

BCF – frequência de batimentos

BS – Botusemen<sup>®</sup>

BSP – Botusemen Special<sup>®</sup>

Ca<sup>++</sup> – cálcio

CASA – computer assisted sperm analysis

CFDA – diacetato de carboxifluoresceína

DMS – diferença mínima significativa

DP – desvio padrão

FITC – isotiocionato de fluoresceína

g – grama

HOST – teste hiposmótico

IA – inseminação artificial

JC-1 – carbocianina catiônica lipofílica

LIN – linearidade

mOsmol – miliosmol

PSA – aglutinina de *Psiumsativum*

STR – retilinearidade

UHT – temperatura ultra alta

VAP – velocidade de trajeto

VCL – velocidade curvilínea

VSL – velocidade progressiva

PI – iodeto de propídeo

ROS – espécies reativas de oxigênio

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVO .....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	13
3.1 Espermatozoide .....	13
3.2 Metabolismo Espermático .....	14
3.3 Plasma seminal .....	14
3.4 Diluentes .....	15
3.5 Técnicas de avaliação da viabilidade da célula espermática .....	19
4. ARTIGO .....	22
INTRODUÇÃO.....	24
MATERIAL E METODOS.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
Conclusão .....	28
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	33
5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	34

## 1. INTRODUÇÃO

Dentro da equinocultura mundial é importante ressaltar a biotecnologia da reprodução como fator em destaque para o melhoramento genético, tendo como foco a utilização da técnica de inseminação artificial (IA). Esta técnica permite o uso de um garanhão para inseminação de determinado número de éguas com foco no aproveitamento das características do animal escolhido. O uso da IA também permite que éguas de outras regiões sejam fertilizadas, além de menor índice de acidentes durante a cobertura, assim como evitar a transmissão de doenças venéreas (OLIVEIRA et al., 2013).

O sêmen equino refrigerado surge então, principalmente como um facilitador para melhor distribuição de material espermático entre éguas de diferentes localidades. Estudos mostram que o sêmen resfriado, mantido em torno de 4°C por 24h, apresenta índices de fertilidade semelhantes aos do sêmen fresco (MATTOS, 1995; KELLER et al., 2001).

A viabilidade espermática é importante para fertilização, ressaltando-se a integridade de membrana e motilidade dos espermatozoides. Para manter a qualidade do sêmen por mais de 12 horas, uma variedade de diluentes com a combinação de alguns componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes, etc.) tem sido desenvolvida para refrigerar o mesmo, com o intuito de manter os parâmetros do sêmen equino em baixas temperaturas (SAMPER, 2011).

Dentre as opções de diluentes encontramos o leite, sendo esse o mais utilizado, pois possui vantagem na praticidade do manejo e por ser de baixo custo, além de fácil acesso. No entanto, devido a variedade de leites oferecidos no mercado, selecionou-se o leite UHT nas composições desnatado (mais utilizado), semidesnatado e integral.

Tendo em vista a busca por diferentes opções de diluentes para sêmen equino refrigerado, foi proposto o uso dos leites UHT semidesnatado e integral para obter resultados semelhantes aos dos desnatado. Foram utilizadas técnicas para análise de viabilidade espermática como metodologia para pesquisa e por fim, comparação com o uso de outros diluentes comerciais.

## 2. OBJETIVO

- Objetivo Principal

Buscar diferentes alternativas de diluentes de fácil acesso para uso na refrigeração de sêmen.

- Objetivos Específicos

Testar o uso de leites UHT semidesnatado e integral na refrigeração de sêmen a 4°C para comparação de viabilidade espermática junto ao leite desnatado.

Avaliar a viabilidade da célula espermática com o uso do leite desnatado como diluente comparando com o uso de outros dois diluentes comerciais conhecidos no mercado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 3.1 Espermatozoide

A célula espermática de equinos se apresenta dividida em cabeça, peça intermediária, peça principal e final. O espermatozoide é revestido por uma membrana plasmática, composta por uma dupla camada de lipídios, proteínas e carboidratos, atuando assim como uma barreira devido a sua característica de permeabilidade seletiva. A sobrevivência do espermatozoide, quando transferido do trato genital do garanhão para genitália da égua, depende fundamentalmente da integridade da membrana plasmática, para manutenção de sua capacidade fertilizante. Diante do exposto, danos a esta estrutura podem levar a perda da homeostase e posterior morte celular, inutilizando a célula espermática (AMANN E GRAHAN, 1993).

Para ocorrer a fecundação do óvulo pelo espermatozoide é necessário um metabolismo para produção de energia, uma motilidade progressiva, enzimas do acrossoma, proteínas da membrana plasmática, distribuição adequada de lipídios no plasma, e na membrana acrossomal. Ressalta-se aqui a importância das proteínas da membrana plasmática, pois as mesmas são responsáveis por auxiliar na sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo (AMANN & GRAHAN, 2011a).

##### 3.1.1 Membrana Plasmática

A membrana plasmática é a estrutura que envolve todo o espermatozoide e tem funções variadas de acordo com a região em que se encontra: cabeça, peça intermediária e flagelo. Compõe a membrana uma dupla camada lipídica, que contém fosfolipídios (divididos em uma parte externa hidrofílica e uma parte interna hidrofóbica), colesterol, glicolipídeos e diferentes tipos de proteínas. Estas representam cerca de 50% do peso da membrana e misturam-se aos lipídios, além disso, estão divididas em periféricas (solúveis no sêmen e na água) e integrais (solúveis por detergentes, mais resistentes) (AMANN & GRAHAM, 2011a).

Sabe-se que alguns fatores podem desencadear a cristalização dos lipídios e a agregação de proteínas, condição de dano irreversível. Um dos fatores que pode causar essa instabilidade na membrana é o resfriamento (OLIVEIRA et al., 2013).

### **3.2 Metabolismo Espermiático**

O metabolismo aeróbico leva a produção de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias, uma peroxidação de lipídios, o que afeta a permeabilidade da membrana plasmática e pode danificar a integridade estrutural, motilidade e viabilidade do espermatozoide. Várias espécies de mamíferos, ressaltando os equinos, possuem espermatozoides com maior suscetibilidade a ação da peroxidação lipídica, pois apresentam uma grande quantidade de ácidos poli-insaturados e baixos níveis de antioxidantes. Busca-se, com a utilização de antioxidantes naturais do plasma seminal ou exógenos, evitar a peroxidação de hidrogênio, porém os efeitos ainda são limitados (PAGL et al., 2006).

Utiliza-se o metabolismo anaeróbico, induzido pelo esgotamento do oxigênio no sêmen diluído, quando em situação de resfriamento lento do sêmen até em torno de 5°C. O resultado deste metabolismo é o acúmulo de ácido láctico. O ácido láctico, quando aumentado, leva a uma redução do pH do meio e conseqüentemente a uma queda na motilidade do espermatozoide, que ocorre devido a diminuição no metabolismo e produção de ATP (AMAMN & GRAHAM, 2011b).

### **3.3 Plasma seminal**

Aurich et al. (2008), descrevem que uma das características relevantes do processo de resfriamento de sêmen é a queda da fertilidade durante as fases de processamento, resfriamento e transporte do material. Diante disto, observa-se que em alguns casos há uma queda significativa ou total da fertilidade que pode estar relacionada a composição do plasma seminal.

O plasma seminal é derivado, principalmente, de secreções do epidídimo e glândulas acessórias. Entre as características benéficas do plasma, destacam-se as suas propriedades antioxidantes, que podem ser melhoradas quando associadas aos diluentes. Entretanto, em relação aos efeitos prejudiciais do plasma seminal sobre os espermatozoides, resalta-se a atividade da enzima lipase que pode estar relacionada ao prejuízo da motilidade do espermatozoide refrigerado. Na eletroforese, já foram identificadas sete bandas que estão presentes no sêmen de todos os ganhos, porém é necessária uma análise mais aprofundada de frações do plasma seminal e proteínas responsáveis pela manutenção do sêmen quando este sofre mudanças de temperatura, como na refrigeração. O estudo e conhecimento das bandas

proteicas podem auxiliar na elaboração de diferentes diluentes conforme as características individuais encontradas em cada sêmen (ZAHN et al., 2006).

### 3.4 Diluentes

Considerando a significativa diminuição da motilidade espermática em equinos, quando realizada a conservação do sêmen por 24h ou mais em refrigeração, torna-se importante a utilização de diluentes específicos, para conservação das propriedades do sêmen, ou seja, a manutenção da fertilidade. A escolha do diluente deve ser baseada no tipo de inseminação utilizada (sêmen fresco, refrigerado ou congelado), tempo de estocagem, temperatura de armazenamento e na individualidade de resposta de cada garanhão ao resfriamento (PAGL et al., 2006).

Baseado nas características do sêmen equino, diluentes devem ter pH e pressão osmótica similares aos do mesmo (PICKETT e AMANN, 1987). O pH do plasma seminal varia entre 7,2 e 7,7 e pode sofrer influência da estação climática do ano, frequência de ejaculação e concentração espermática (SKAIFE, 2011). Entretanto, o pH do diluente deve variar entre 6,7 e 7,2, para não interferir na viabilidade espermática durante o armazenamento, e a osmolaridade do fluido seminal em torno de 300mOSmol/kg para manter a estabilidade da membrana (BRINSKO & VARNER, 1992).

Para o sucesso no processo de inseminação artificial com o uso de diluentes é importante realizar uma avaliação da concentração espermática (medida em milhões por ml). A concentração ideal para diluição é de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml (RIGBY et al., 2001). Durante a temporada reprodutiva a média de concentração espermática encontrada é de 50-150  $\times 10^6$  espermatozoides/ml, considerando uma coleta de sêmen diária ou a cada dois dias (SIEME, 2009).

Visando o aprimoramento de um produto que mantenha as características do sêmen com menor número de alterações possíveis, chegou-se aos diluentes industrializados, que além de manter as características do sêmen possuem em sua composição elementos minerais e substâncias que neutralizam produtos tóxicos, como antibióticos, e que conferem uma proteção ao choque térmico (OLIVEIRA et al., 2013).

Utilizam-se caixas isotérmicas como método para resfriamento de sêmen diluído, onde o material é colocado em recipiente apropriado próximo a uma fonte de baixa temperatura (gelo biológico reciclável), que de acordo com o sistema deixará o sêmen resfriado de 15 a

20°C ou de 4 a 6°C. Com a baixa da temperatura do sêmen, ocorre a conservação do material devido a diminuição do crescimento bacteriano, redução do metabolismo espermático e consequentemente controle da acidificação do meio diluidor. Além disso, há a diminuição da formação de espécies reativas de oxigênio (*Reactive oxygen species* - ROS). O estresse oxidativo é um fator associado ao declínio da fertilidade durante o armazenamento do sêmen, destacando o peróxido de hidrogênio pela perda de motilidade espermática (KATILA, 1997; BALL, 2001).

A adição de antibióticos é um relevante componente do diluente. Sabe-se que na coleta do sêmen com vagina artificial existe a contaminação com bactérias dos órgãos genitais externos. A eficácia dos antibióticos geralmente é entre 8-15°C, temperatura que favorece crescimento bacteriano. Depois de atingir a temperatura de armazenamento, o antibiótico não elimina mais bactérias apenas inibe um maior crescimento. O antibiótico de eleição é a gentamicina junto a composição do diluente (AURICH et al., 2007). Importante ressaltar a concentração de antibiótico usado já que Jasko et al. (1993) relataram efeitos negativos da gentamicina sobre as características de movimento do esperma, quando foram usadas concentrações superiores a 1g/mL.

#### 3.4.1 Leite

Sabe-se que os diluentes mais utilizados para o sêmen equino, são compostos principalmente de leite desnatado ou gema de ovo. O leite é rico em lipoproteínas, e possui a função de estabilizar elementos proteicos da membrana da célula espermática (OLIVEIRA, et al., 2013).

Batellier et al. (2001), citam que a utilização de diluentes a base de leite é mais adequada quando as amostras de sêmen equino são armazenadas em torno de 4°C, podendo o diluente ser aplicado também em amostras com resfriamento até 15°C, porém se mostrou ineficiente para amostras entre 8°C e 15°C devido a proliferação bacteriana. Segundo Machado et al. (1998) a proliferação de microorganismos é inevitável, embora o desenvolvimento microbiano seja lento entre 0 e 5°C. Com isso, o leite não mantém as suas propriedades e estabilidade a longo prazo.

As principais proteínas do leite são as caseínas (80% do total de proteínas do leite). Elas aparecem em grandes agregados coloidais denominados micelas. As outras proteínas do leite são chamadas coletivamente proteínas de soro do leite (20% de proteínas totais do leite). A  $\alpha$ -lactoalbumina e a  $\beta$ -lactoglobulina são as principais proteínas do soro, estando em uma

proporção de 22 e 55%, respectivamente (AMIOT et al., 2002). As proteínas do leite agem de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, ou seja, estabilizando as membranas (AMANN e GRAHAM, 1993). As caseínas assim como os lipídios, ligam-se fortemente com íons Cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ), o que impede acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de  $\text{Ca}^{++}$  que causam danos nas membranas (HOCHACHKA, 1986).

Já a lactenina, outro componente do leite, porém tóxico, é um agente antistreptocócico encontrado no leite que pode ser inativado quando no processo de aquecimento do leite entre 92 e 95°C (TRACKER et al., 1953). Householder et al. (1981) realizaram estudo para determinar se o leite desnatado sem aquecimento é prejudicial para espermatozoides, com verificação da percentagem de espermatozoides progressivos de 0 a 96h, e concluíram que a motilidade dos espermatozoides foi maior no leite aquecido independentemente da temperatura de incubação.

O leite tratado à temperatura ultra alta (UHT) é um leite homogeneizado, submetido a temperaturas maiores que 132°C, processo que converte o leite em praticamente estéril. Permanece em condições aceitáveis vários meses, sem necessitar de refrigeração, características que favorecem o manejo quanto à utilização como diluente para sêmen equino.

A diferença do leite pasteurizado para leite UHT, na preservação da motilidade espermática, foi analisada por Batellier et al. (1995). Os autores concluíram que a desnaturação da lactoalbumina parece ser a modificação mais importante de leite para explicar a diferença de sobrevivência espermática entre o leite desnatado pasteurizado e o leite desnatado UHT.

O leite UHT é vendido comercialmente como desnatado, semidesnatado e integral. O leite integral tem a mesma composição que o leite desnatado, água (87,5%), proteínas (3,2%), açúcares (principalmente lactose, 4,6%) e minerais, no entanto, o leite integral tem 3,7% de lipídios enquanto que o desnatado tem menos que 0,1%. Os lipídios podem prevenir o choque térmico agindo como quelantes de cálcio do meio extracelular, impedindo assim a entrada desse íon nos espermatozoides, que desestabilizaria a membrana espermática (AMIOT et al., 2002). O leite semidesnatado tem a mesma composição dos demais porém a quantidade de lipídios varia entre zero e 3%.

No trabalho de Meirelles et al. (1998) foi analisado o sêmen diluído com dois leites desnatados UHT de marcas diferentes: A (0,5% de gordura) e B (0,1% de gordura); refrigerados à 4°C numa diluição com proporção 2:1 (diluente:sêmen). O leite da marca A provocou queda significativa de motilidade às 24h quando comparado ao leite da marca B. Os

autores concluíram que este fato pode estar relacionado à maior quantidade de gordura apresentada por este diluente, provocando uma maior aglutinação dos espermatozoides.

Assim como os diluentes comerciais adicionam antibióticos em sua composição para aumentar a durabilidade do sêmen, surge como opção a adição de antibióticos ao leite. Vieira et al. (2002), analisaram em estudo comparativo, leite em pó desnatado, leite em pó desnatado com gentamicina (50µg/mL) e penicilina (50UI/mL), e leite em pó desnatado com amicacina (1000µg/mL) e penicilina (1000UI/mL), através da avaliação da motilidade espermática e da integridade da membrana. Não houve alteração significativa na comparação entre os leites estudados, na motilidade e integridade de membrana logo após a diluição. No entanto, observou-se que a partir das 24h de armazenamento a 4°C, o leite acrescido de amicacina e penicilina teve queda na motilidade, o que levou a conclusão de que a adição de doses elevadas de antibióticos ao diluente de sêmen afeta a motilidade quando o sêmen é preservado a 4°C por mais de 24h.

Para uma melhor avaliação da eficiência de diluentes a base de leite, tornou-se necessário uma comparação junto aos diluentes industrializados, os quais possuem comumente adição de antibióticos a sua composição. Le Frapper et al. (2010), citaram a necessidade de identificar diluentes que possam manter a motilidade adequada por mais de 24 horas a 4°C, sendo de grande utilidade para a indústria equina. Farras et al. (2008), utilizaram uma variedade de diluentes com combinações diferentes de componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes, etc.), com a finalidade de melhorar a qualidade do sêmen equino refrigerado, buscando manter a motilidade e a integridade da membrana espermática para melhor índice de fertilidade. Não houve diferença entre os diluentes comerciais testados devido ao alto padrão de motilidade dos garanhões utilizados.

Diante da variedade de diluentes industrializados, destacou-se um diluente novo no mercado, de marca já consagrada na produção de produtos em biotecnologia veterinária. Embora desconhecida as porcentagens e todos os componentes da fórmula deste diluente industrializado, por motivo de sigilo comercial, este tem por objetivo aumentar a longevidade do sêmen refrigerado.

### 3.5 Técnicas de avaliação da viabilidade da célula espermática

As avaliações *in vitro* do sêmen são de grande importância para a análise das características relacionadas com a capacidade fecundante do espermatozoide, tais como: motilidade, funcionalidade de membrana e integridade de membrana plasmática.

#### 3.5.1 Motilidade espermática, motilidade progressiva e vigor

A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, estimando-se sua porcentagem visualmente. No entanto, é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e continua tendo grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (ARRUDA et al., 2011). O sêmen é considerado de baixa qualidade, quando na avaliação de campo ao microscópio apresenta motilidade diminuída.

A motilidade total é definida como a porcentagem de espermatozoides que apresentam movimento circular e progressivo. Entende-se por motilidade progressiva, a porcentagem de células que estão se movimentando de forma linear, assim como as que realizam movimentos circulares amplos. Uma ótima fertilidade pode ser identificada com a presença de  $\geq 60\%$  de motilidade progressiva no campo amostral, sendo, de preferência, o sêmen diluído para realização da análise, pois tende a ocorrer aglutinação e o movimento do espermatozoide pode ser comprometido (SIEME, 2009).

Para avaliação da motilidade espermática, também se pode utilizar o sistema de análise computadorizada de motilidade espermática por imagem (*computer assisted sperm analysis – CASA*) que avalia os seguintes parâmetros: Motilidade Total em porcentagem, referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no *setup*, sendo a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva em porcentagem, que refere-se à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), que é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), que é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), que é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade

(STR, %), que é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), que é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida em porcentagem (ARRUDA et al., 2011).

Diante da análise mais precisa do campo de células espermáticas, objetiva-se uma avaliação mais confiável e imparcial de avaliação da motilidade espermática do que um exame subjetivo (ARRUDA et al., 2011).

Entretanto, para determinar a velocidade do movimento dos espermatozoides, usa-se avaliação de vigor espermático, que é feito com uso do microscópio durante o teste de motilidade. A avaliação é subjetiva e apresentada em escala de 1 a 5, sendo 1 para menor velocidade e 5 para maior velocidade (CBRA, 1998).

### 3.5.2 Sondas Fluorescentes

A funcionalidade das organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos podem ser monitorados por procedimentos específicos de coloração, como sondas fluorescentes (ARRUDA et al., 2011). Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio, corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342), SYBR-14 e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA); o iodeto de propídio (PI) e a aglutinina de *Pisium sativum* (PSA), que quando associado à isotiocionato de fluoresceína (FITC), avalia a integridade do acrossomo de células espermáticas equinas. Quanto à avaliação da peça intermediária da célula espermática destaca-se a sonda carbocianina catiônica lipofílica, também conhecida como JC-1, e é utilizada para a avaliação mitocondrial, onde identifica a capacidade de produção de ATP desta organela (ARRUDA et al., 2007).

Ressalta-se a combinação das sondas de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). O CFDA é utilizado para identificação de células vivas, pois esta sonda penetra na membrana do plasma e sofre ação das esterases presentes na membrana do espermatozoide vivo, o composto fluorescente fica retido no citoplasma e quando exposto ao comprimento adequado de luz emitida, adquire fluorescência verde. O marcador apenas identifica as células vivas com esterases intracelulares ativas em membrana intacta (SIEME, 2009).

Para identificação de células mortas, utiliza-se o iodeto de propídio, fluorescente vermelho, que somente ultrapassa membranas danificadas (SKAIFE, 2011). O PI não ultrapassa membrana intacta e ao penetrar na membrana danificada, liga-se ao DNA nucleico

de espermatozoides mortos e emite coloração vermelha em resposta ao comprimento adequado de luz (SIEME, 2009).

### 3.5.3 Citometria de Fluxo

Visando uma avaliação mais analítica do campo amostral de células espermáticas, pode-se utilizar, dentre os diferentes métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, a citometria de fluxo, que é um método de análise computadorizada de milhares de células por segundo. A citometria de fluxo é combinada com a fluorescência, onde geralmente se avalia em torno de 100 a 200 células, para obter um ganho amostral, sendo utilizada para mensurar a viabilidade espermática de diferentes espécies. A citometria de fluxo combinada também permite a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, integridade do DNA, peroxidação lipídica, capacitação e reação acrossômica e apoptose (ARRUDA et al., 2007).

### 3.5.4 Funcionalidade de Membrana

A avaliação da funcionalidade da membrana, ou seja, sua capacidade a efetuar o equilíbrio osmótico, é realizada através do teste hiposmótico (HOST) que analisa a funcionalidade da membrana espermática com a exposição do sêmen em meio hiposmótico. Na tentativa de se alcançar o equilíbrio osmótico há a entrada de água na célula espermática o que leva ao aumento do volume e turgidez da membrana plasmática. A região mais suscetível ao teste hiposmótico é o flagelo, por apresentar uma membrana mais frágil, e melhor identificada devido à capacidade do flagelo de se dobrar na presença de solução hiposmótica, o que só ocorre quando a membrana está íntegra (ARRUDA, et al., 2011).

## 4. ARTIGO

### Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado

Fabiana Santos Castro<sup>a</sup>; Sandra Fiala Rechsteiner<sup>b</sup>; Rodrigo Costa Mattos<sup>a</sup>

<sup>a</sup>REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

<sup>b</sup>HISTOREP, Faculdade de Veterinária UFPEL, Pelotas, Brasil

e-mail: fscfab@gmail.com

Dois experimentos foram conduzidos para verificar a viabilidade do uso do leite UHT como diluente para sêmen equino refrigerado. O objetivo principal deste estudo foi avaliar o uso de leite UHT nas apresentações desnatado, semidesnatado e integral como diluente de sêmen e posteriormente foi avaliada a viabilidade espermática com o uso de leite como diluente comparado a outros dois diluentes industrializados. No experimento I foram utilizados 31 ejaculados de 3 garanhões, as amostras de cada ejaculado foram diluídas em leite UHT nas apresentações integral, semidesnatado e desnatado, numa proporção de 3:1 (3 ml de diluente e 1ml de sêmen). Foram realizadas análises de viabilidade espermática com testes de motilidade espermática, vigor espermático, integridade de membrana (CFDA/PI) e funcionalidade de membrana espermática (HOST) pós-diluição, os quais foram repetidos nas amostras refrigeradas a 4°C após 24 e 48h. Neste experimento, não foram observadas diferenças significativas entre os 3 diluentes, quanto a motilidade espermática, vigor, CFDA/PI e HOST. No entanto, houve uma diminuição na qualidade do sêmen armazenado por 48h ( $P < 0,01$ ), sendo mais acentuada entre 24 e 48h de refrigeração. No experimento II foram utilizados 30 ejaculados de 3 garanhões onde, logo após a coleta do sêmen, as amostras de cada ejaculado foram diluídas com leite UHT desnatado (LD), Botusemen<sup>®</sup> (BS) e Botusemen Special<sup>®</sup> (BSP). As amostras foram examinadas a fresco, após a diluição (0h) e em resfriamento de 24h e 48h a 4°C. Foram realizados os mesmos testes de análise espermática do primeiro experimento para avaliação comparativa dos diluentes. As amostras de sêmen refrigeradas com BSP obtiveram maior porcentagem de motilidade total (51,1%) após 24h de refrigeração quando comparado aos outros dois diluentes testados, LD (45,8%) e BS (47,3%). Com base nos resultados obtidos nos dois experimentos, o leite UHT, independente da apresentação, pode ser utilizado como diluente de sêmen para as primeiras 24h de refrigeração, mantendo a viabilidade espermática adequada, sendo também de fácil acesso e manuseio. Se for necessário a manutenção do sêmen por mais de 24h, o BSP se mostrou superior em manter a qualidade do sêmen até 48h.

Palavra-chave: garanhão, refrigeração, sêmen, leite UHT, diluente

## ABSTRACT

*Two experiments were conducted to verify the feasibility of the use of UHT milk as an extender for chilled equine semen. The main objective of this study was to evaluate the use of UHT milk in skimmed, semi-skimmed and whole milk as extender for semen and subsequently assess sperm viability using milk as a diluent compared to two other industrial extenders. In the first experiment were used 31 ejaculates from 3 stallions of known fertility, samples of each ejaculate were diluted in the whole UHT milk, semi-skimmed milk and skim milk shows a ratio of 3:1 (3ml diluent and 1ml of semen). sperm viability analyzes were performed, including sperm motility, sperm vigor, membrane integrity (CFDA/PI) functionality and sperm membrane (HOST) post-dilution tests which were repeated in the samples cooled to 4°C after 24 and 48h. In this experiment, no significant differences in sperm motility, vigor, CFDA/IP and HOST were observed among the 3 extenders. However, there was a decrease in the quality of semen stored for 48h ( $P < 0.01$ ), being more pronounced between 24 and 48h of cooling. In the second experiment, 30 ejaculates from 3 stallions were used soon after collection of semen samples; each ejaculate was diluted with UHT skim milk (LD), Botusemen<sup>®</sup> (BS) and Botusemen Special<sup>®</sup> (BSP). The samples were analyzed fresh, immediately after the dilution (0h) and after cooling for 24h and 48h at 4°C. The same tests of sperm analysis used in the first experiment for comparative evaluation of extenders were performed. Semen samples cooled with BSP obtained the highest percentage of total motility (51.1%) after 24h of cooling when compared to the two other extenders tested, LD (45.8%) and BS (47.3%). Based on the results from the two experiments, UHT milk, regardless of the presentation, can be used as a diluent of semen during the first 24h of cooling maintaining adequate sperm viability and is easy to access and handle. If maintenance of semen for more than 24h is required, the BSP was superior in maintaining the quality of semen until 48h.*

*Keyword: stallion, semen, cooling, UHT milk, extender*

## INTRODUÇÃO

Para aproveitamento das características genéticas de garanhões pode se utilizar da inseminação artificial (IA) para fertilização de determinado número de éguas, sendo o resfriamento do sêmen uma técnica utilizada para proporcionar armazenamento e transporte adequado deste material espermático.

No resfriamento ocorre uma queda da fertilidade durante as etapas de processamento, conforme Aurich (2008) relatou. Em torno de 5°C o espermatozoide utiliza metabolismo anaeróbico, o qual é induzido pelo esgotamento de oxigênio, provocando a redução do pH, diminuição do metabolismo e produção de ATP, resultando em queda de motilidade (AMANN & GRAHAM, 2011). Desta forma, é importante a utilização dos chamados diluentes para a conservação das propriedades do sêmen resfriado a 5°C por 24h ou mais de armazenamento (PAGL et al., 2006).

A manutenção da capacidade fertilizante do espermatozoide depende da integridade da membrana plasmática (AMANN & GRAHAM, 1993). Dentre os testes que avaliam a integridade podemos destacar o hiposmótico e a técnica da fluorescência. Alguns fatores podem desencadear a cristalização dos lipídios e a agregação de proteínas presentes na membrana, um deles é o resfriamento do sêmen, que pode levar a uma instabilidade na membrana plasmática (OLIVEIRA et al., 2013).

O leite é utilizado tanto como diluente de fácil acesso, como base para diluentes industrializados para resfriamento de sêmen, pois em torno de 5°C o leite UHT (*ultra high temperature*) desnatado apresenta melhor eficiência para armazenamento de sêmen por 24h, conforme Batellier et al. (2001). O leite UHT é comercializado em três apresentações diferenciadas pela quantidade de lipídios em sua composição, sendo o desnatado com < 0,1%, o integral com 3% e o semidesnatado de 0 a 3% de lipídios. O leite tratado a temperatura ultra alta, permanece em condições aceitáveis durante vários meses, sem necessitar de refrigeração, características que favorecem sua utilização como diluente para sêmen equino.

Os diluentes industrializados, além de promover proteção à membrana plasmática dos espermatozoides no choque térmico, contêm substâncias, que neutralizam produtos tóxicos provenientes do crescimento bacteriano, como os antibióticos (OLIVEIRA et al., 2013). Recentemente alguns diluentes comerciais foram desenvolvidos para favorecer a viabilidade espermática durante a refrigeração, buscando-se um diluente que possa manter a motilidade adequada para inseminação por mais de 24h a 4°C.

Este trabalho teve por objetivo o estudo de novas alternativas de diluentes, de fácil acesso para uso na refrigeração de sêmen, num período acima de 24 horas em refrigeração a 4°C, utilizando para este fim diferentes tipos de leite e comparando o leite desnatado com diluentes industrializados.

## **MATERIAL E METODOS**

O experimento foi realizado junto ao laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) que se localiza na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Foram utilizados três garanhões em atividade sexual com idade entre 3 a 11 anos, alojados na Faculdade de Veterinária da UFRGS. A alimentação foi composta por pastagem natural e suplementação com concentrado a base de aveia. No primeiro experimento foram realizadas 11 coletas de dois garanhões e apenas 9 de um outro que adoeceu no período e foi retirado do experimento. Já no experimento II foram realizadas 10 coletas de cada garanhão. Nos dois experimentos as coletas foram realizadas duas vezes por semana, durante dois meses na estação reprodutiva de 2012. Para as coletas do sêmen, foram utilizadas éguas em cio com devido material de contenção, vagina artificial modelo Hannover a uma temperatura de 43°C.

A fração gel do ejaculado foi separada através de um filtro acoplado ao copo coletor de sêmen. Em seguida o sêmen foi avaliado macroscopicamente, quanto ao volume e aspecto em uma proveta estéril graduada.

A concentração espermática foi determinada através de espectrofotometria. A motilidade espermática foi determinada em microscopia óptica com contraste de fase, em um aumento de 250x. O vigor espermático foi avaliado em escala de 1 a 5.

## **AVALIAÇÃO DO SEMEN DILUIDO**

### **Experimento I**

O sêmen foi fracionado em 3 partes para cada garanhão e diluído com leite UHT integral (LI), semidesnatado (LS) ou desnatado (LD), em uma proporção de 3:1, ou seja 3ml de diluente e 1ml de sêmen. Imediatamente após a diluição foram realizados exames de motilidade e vigor, utilizando a mesma metodologia usada para sêmen fresco, sendo também

realizadas análises de integridade de membrana e funcionalidade de membrana espermática. As amostras foram então armazenadas em um refrigerador a 4°C, e todas as análises foram repetidas as 24 e 48h.

## Experimento II

O sêmen foi fracionado em três partes para cada garanhão, com leite UHT desnatado na proporção 3:1, enquanto que os diluentes Botusemen<sup>®</sup> e Botusemen Special<sup>®</sup> foram acrescentados ao sêmen seguindo a diluição recomendada pelo fabricante do produto de acordo com a concentração espermática no exame do sêmen fresco.

Imediatamente após a diluição foram realizadas as mesmas avaliações do experimento I. Na análise de integridade de membrana foram utilizados dois corantes fluorescentes: Iodeto de propídio (preparado com 0,5mg de PI diluído 1ml de solução fisiológica) e carboxifluoresceína (preparado com 0,46mg CFDA diluído 1ml de DMSO – Dimetilsulfóxido). Para essa avaliação, dilui-se 400µl de sêmen, com 3µl de iodeto de propídio e 2µl de carboxifluoresceína, em um microtubo previamente coberto em papel alumínio, para evitar incidência da luz. A aplicação das sondas fluorescentes era realizada em sala escura. As amostras foram colocadas em banho maria a 37°C durante 8min. Após este período, foi examinado em microscópio óptico com contraste de fase, em um aumento de 1000x, utilizando-se óleo de imersão, com a contagem de 100 células entre células coradas de vermelho e verde. Para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática foi utilizado o teste hiposmótico. Neste foi utilizado 200µl de água destilada e 100µl de sêmen seguindo a técnica de LOMEIO & GIAMBERSIO (1991) modificado por LAGARES et al. (1998). As amostras foram incubadas em banho maria a 37°C por 8min, para posterior observação em microscópio óptico de contraste de fase em um aumento de 400x. Foram observados os espermatozoides que apresentaram a cauda enrolada e cauda reta. Foi realizada a contagem de 100 células por lâmina.

## Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do método não paramétrico de Kruskal-Wallis. Como variáveis dependentes foram utilizados o tempo, e como independentes o diluente utilizado e as análises realizadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento I não foi observada diferença significativa entre os diluentes: leite UHT desnatado com 0% de gordura, semidesnatado com 1% de gordura e integral com 3% de gordura; e não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as médias de motilidade espermática, vigor, integridade de membrana e funcionalidade de membrana (Tabela 1). No entanto Meirelles et al. (1998), analisaram sêmen diluído em leite desnatado contendo 0,5% de gordura e 0,1% de gordura e concluíram que o leite que apresentava maior índice de gordura teve uma maior queda de motilidade. Os autores sugerem que a queda da motilidade está relacionada a maior quantidade de gordura, a qual provocaria uma maior aglutinação dos espermatozoides. Neste experimento houve ( $P < 0,01$ ) uma diminuição gradativa da qualidade do sêmen armazenado durante as 48h, sendo mais acentuada entre as 24h e 48h de refrigeração, comprovada em todas as análises realizadas e nos cinco parâmetros examinados demonstrados na Tabela 1. Diferente do estudo de Meirelles et al. (1998) que demonstraram diferença na observação da motilidade relacionada ao maior índice de gordura do leite, este estudo não apresentou diferença, este fato pode estar relacionado a diluição do sêmen utilizada no experimento, onde foi utilizado diluição do leite desnatado na proporção 2:1, ou seja, duas medidas de diluente para uma medida de sêmen, e no presente estudo foi realizada diluição do leite na proporção de 3:1.

Householder et al. (1981), sugerem a utilização do leite desnatado como diluente em sêmen refrigerado, devido a facilidade de preparação para análise espermática no microscópio para um exame subjetivo, ressaltando que a visualização da motilidade é prejudicada pela presença de gotículas de gordura. No entanto, neste estudo se observou que não há diferença na avaliação da motilidade quando utilizados leites com diferentes porcentagens de gorduras. Nas 24h de análise da motilidade total o LD, LS e LI apresentaram respectivamente, 41,29%, 40,8%, 42,25%.

Tendo em vista que cada ganhão possui características individuais distintas, conforme Province et al. (1985), a escolha do diluente deve ser baseada, entre outros aspectos, nas características dos animais, pois segundo os autores, não há um diluente que seja ideal para utilização em todos os ganhões com a mesma efetividade final.

Segundo Samper et al. (2011), o índice de prenhez das éguas é altamente dependente da fertilidade do sêmen refrigerado, sendo utilizada uma porcentagem de motilidade  $> 35\%$  para aplicação da técnica convencional de inseminação no corpo uterino da égua. O estudo realizado não demonstrou diferença na motilidade dos ganhões nas 24h, onde se observou

índices de motilidade total 41,29%, 40,8% e 42,25% para os diluentes LD, LS e LI respectivamente (Tabela 1). Neste aspecto, Le Frapper et al. (2010), cita a necessidade de identificar diluentes que possam manter a motilidade adequada por mais de 24h a 4°C. A indústria de produtos equinos, ciente dessa necessidade do mercado, investiu no desenvolvimento de diluentes para utilização de indiferentes garanhões com base no melhor aproveitamento das características individuais de cada animal. Diante disso, notou-se no experimento II (Tabela 2), que o diluente Botusemen Special<sup>®</sup> (BSP), quando comparado aos diluentes leite desnatado UHT (LD) e Botusemen<sup>®</sup> (BS) promoveu uma maior longevidade dos espermatozoides principalmente entre 24 e 48h de refrigeração.

Não houve diferença significativa nas primeiras 24h de motilidade total: LD (45,8%), BS (47,3%) e BSP (55,1%). No entanto houve diferença significativa nos seguintes testes: na funcionalidade de membrana (HOST), LD (37,2%), BS (33,3%), BSP (46,1%), e no teste de integridade de membrana (CFDA/PI) (59,9%), BS (52,7%), BSP (65,1%). Em todos os testes realizados houve uma maior manutenção da qualidade espermática quando se utilizou o diluente industrializado BSP nas 48h, diferente do leite desnatado UHT que foi semelhante aos demais até as 24h, e do BS que se apresentou similar ao leite desnatado no mesmo período. Ressalta-se aqui que o diluente industrializado BSP apresentou em 48h índices similares de funcionalidade de membrana aos índices apresentados pelos diluentes LD e BS em 24h de refrigeração (Tabela 2).

Uma das hipóteses para a variação significativa nos testes de viabilidade da célula espermática durante 48h de refrigeração a 4°C para o diluente BSP em relação ao BS, pode ser devido à sua composição que segundo as especificações do fabricante, possui substâncias responsáveis pela maior viabilidade espermática, porém não divulgadas pela indústria. Ainda assim, há necessidade de estudos mais aprofundados com animais de padrões espermáticos diferenciados para constatar a influência dessas substâncias e obter níveis aceitáveis para a fertilização equina.

## **Conclusão**

Este estudo demonstrou a eficácia da utilização de leite UHT desnatado, assim como semidesnatado ou integral, como diluentes com níveis aceitáveis de motilidade para manutenção da viabilidade da célula espermática em até 24h na refrigeração a 4°C. Os índices dos diferentes leites UHT se mostraram similares na avaliação espermática, motilidade total,

vigor, funcionalidade de membrana e integridade de membrana, o que possibilita o uso de qualquer um dos tipos de leite UHT testados como diluente eficaz em 24 horas. No entanto, o diluente industrializado, em destaque o Botusemen Special<sup>®</sup> se mostrou superior aos demais diluentes utilizados, leite UHT desnatado e Botusemen<sup>®</sup>, na manutenção de viabilidade entre 24 e 48h. Já o Botusemen<sup>®</sup> apresentou parâmetros similares ao diluente leite UHT desnatado.

Com base nos parâmetros encontrados nos experimentos I e II deste estudo, conclui-se que o leite UHT, independente do tipo pode ser utilizado como diluente para as primeiras 24h de refrigeração, porém quando for necessária refrigeração em até 48h o diluente industrializado se mostrou mais adequado.

Tabela 1 Médias dos parâmetros seminais avaliados a fresco e após diluição em leite UHT desnatado, semidesnatado e integral em 0, 24 e 48h.

Exame	Fresco	0 hora			24 horas			48 horas		
		LD	LS	LI	LD	LS	LI	LD	LS	LI
Mot T. %	63a	66,12a	64,32ab	64,35ab	41,29b	40,8b	42,25ab	17,25c	17,58c	18,27c
Vigor	2,23a	2,35a	2,22a	2,16a	1,7b	1,67b	1,67b	1c	0,93c	0,93c
HOST %	–	48,93a	47,06a	47,06a	35,77b	34,77b	35,58b	17,38c	16,48c	18,55c
CFDA/PI %	–	77,61a	76,7ab	74,67ab	70,45ab	67,77ab	65,45b	42,45c	38,96c	38c

Médias de motilidade total (Mot. T%), vigor (1 a 5), funcionalidade de membrana (HOST %), e integridade de membrana (CFDA/PI %).

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

Tabela 2 Médias dos parâmetros de sêmen equino diluído em leite desnatado UHT, Botusemen® e Botusemen Special®

Exame	Fresco	0 hora			24 horas			48 horas		
		LD	BS	BSP	LD	BS	BSP	LD	BS	BSP
Mot T. %	63,66 <sup>a</sup>	68,3 <sup>a</sup>	68,3 <sup>a</sup>	67,6 <sup>a</sup>	45,8 <sup>bc</sup>	47,3 <sup>bc</sup>	55,1 <sup>b</sup>	11,6 <sup>e</sup>	23,6 <sup>d</sup>	38,6 <sup>c</sup>
Vigor	2,7 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>	2,9 <sup>a</sup>	2,76 <sup>ab</sup>	2,1 <sup>cd</sup>	2,2 <sup>cd</sup>	2,4 <sup>c</sup>	0,9 <sup>f</sup>	1,5 <sup>e</sup>	1,8 <sup>de</sup>
HOST %		54,7 <sup>a</sup>	54,7 <sup>a</sup>	46,1 <sup>b</sup>	37,2 <sup>c</sup>	33,3 <sup>c</sup>	46,1 <sup>b</sup>	20,2 <sup>d</sup>	20,1 <sup>d</sup>	34,7 <sup>c</sup>
CFDA/PI %		74,1 <sup>a</sup>	74,1 <sup>a</sup>	70,1 <sup>ab</sup>	59,9 <sup>cd</sup>	52,7 <sup>d</sup>	65,1 <sup>c</sup>	33 <sup>e</sup>	28,5 <sup>e</sup>	53,3 <sup>d</sup>

Médias de motilidade total (Mot T%), vigor (1 a 5), funcionalidade de membrana (HOST %), e integridade de membrana (CFDA/PI).

Letras diferentes na mesma linha demonstram diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

## REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- Amann, R. P.; Graham, J. K. 1993.** Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Filadelfia: Lea & Febiger, cap.80, pp.715-745.
- Amann, R. P.; Graham, J. K. 2011.** Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Wiley-Blackwell, cap.102, pp.1062-1064.
- Aurich, C. 2008.** Recent advances in cooled-semen. *Theriogenology*. 107: pp.268-275.
- 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: pp.181-190.
- Householder, D. D.; Pickett, B. W.; Voss, J. L. 1981.** Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. *Journal Equine Veterinary Science*, n.1: pp.9-13.
- Meirelles, L. S.; Neves, A. P.; Vieira, M. J.; Keller, A.; Hott, A. K.; Moraes, I. M. A.; Garbade, P.; Gregory, R. M.; Mattos, R. C. 1998.** Uso de leite em pó desnatado não inativado e do leite desnatado UHT na preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. *Ciência Rural*, Santa Maria, 28(3): pp.467- 470.
- Lagares, M. A.; Petzolt, R.; Sieme, H.; Klug, E. 1998.** Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivo Faculdade de Veterinária*. UFRGS. 26(1): pp.2942.
- Lefrapper, L.; Walston, L.; Whisnant, C. S. 2010.** Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. *Journal of Equine Veterinary Science*. 30(4): pp.200-204.
- Lomeo, A. M.; Giambersio, A. M. 1991.** Water test: A simple method to asses sperm membrane integrity. *Internacional Journal of Andrology*. V.14, pp.278-282.
- Oliveira, G. C.; Oliveira, B. M. M.; Celeghini, E. C. C.; Fernandes, C. B.; Mattos, C. B. 2013.** Cryopreservation of equine semen: a review. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 37(1): pp.23-28.
- Pagl, R.; Aurich, J. E.; Muller-Schlosser, F.; Kankofer, M.; Aurich, C. 2006.** Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenology*. V. 66, pp.1115-1122.
- Province, C. A.; Squires, E.; Pickett, B. W.; Amann, R. O. 1985.** Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*. V. 23, pp. 925-934.
- Samper, J. C. 2011.** Breeding with cooled transported semen. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Wiley-Blackwell, cap.128, pp.1321.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AMIOT, J.; FOURNIER, S.; LEBOEUF, B.; PAQUIN, P.; SIMPSON, R. Composition, propriétés physico-chimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait. In: Vignola CL (Ed.). **Science et Technologie du Lait**, Transformation du Lait. Montréal: Presses Internationales Polytechnique. pp. 1-73. 2002.

AMMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 1. ed. Filadelfia: Lea & Febiger, cap. 80, p. 715-745. 1993.

AMMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Wiley-Blackwell, V.1, cap. 102, p. 1054-1055. 2011a.

AMMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Filadelfia: Lea & Febiger, p. 1062-1064. 2011b.

ARRUDA, R. P; CELEGHINI, E. C. C; ANDRADE A. F. C; GARCIA A. R; NASCIMENTO J.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 1, Londrina, PR. Londrina: [s.n.], 2004. V.1, p. 166-179. 2004.

ARRUDA, R. P; ANDRADE, A. F. C; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotechniques used to assessment of fertility potential of equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.

ARRUDA, R. P; CELEGHINI, E. C. C; ALONSO, M. A; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F; AFFOSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Methods of the assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.145-151, abr./jun. 2011.

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. **Theriogenology**. V. 107, p.268-275, 2008.

BALL, B. A; MEDINA, V. C. G.; GRAVANCE, C. G; BAUMBER, I. Effect of Antioxidants on preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa During Storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p. 577-589, 2001.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, p. 391-410, 1995.

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.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p. 205-218, 1992.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 1998.

FARRAS, M. C.; AVANZI, B. R.; MELO, C. M.; DELL AQUA, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de Diferentes Diluentes na Manutenção das Características do Sêmen Equino em dois Sistemas de Refrigeração Passiva. **Ciência Animal Brasileira**, (9): 3, p. 693-699, 2008.

HOCHACHKA, P. W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. **Science**, v. 231, p. 234-241, 1986.

HOUSEHOLDER, D. D.; PICKETT, B. W.; VOSS, J. L. Effect of extender, number of spermatozoa and HCG on equine fertility. **Journal Equine Veterinary Science**, n.1, p. 9-13, 1981.

JASKO, D. J.; BEDFORT, S. J.; COOK, N. L.; MUMFORT, E. L.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 40: p.885-93, 1993.

KAYSER, J. P.; AMANN, R. P.; SHIDELER, R. K.; SQUIRES, E. L.; JASKO, D. J.; PICKETT, B. W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, 38: p.601-614, 1992.

KATILA, T.; COMBES, G. B.; VAMERA, D. D.; BLANCHARD, T. L. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, 48: p.1085-1092. 1997.

KELLER, A.; MALSCHITZKY, E.; HOTT, A.; VIERIRA, M. J.; MATTOS, R.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 318-319, 2001.

LEFRAPPER, L.; WALSTON, L.; WHISNANT, C. S. Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 4, 2010.

MACHADO, T. F. Alteração e conservação do leite. Fortaleza: **EMBRAPA – CNPAT**, 1998. 26 p. (EMBRAPA -CNPAT. Documentos, 24).

MATTOS, R. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, 144p. 1995.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2011. v.1, cap. 102, p. 1062-1064b.

MEIRELLES, L. S.; NEVES, A. P.; VIEIRA, M. J.; KELLER, A.; HOTT, A. K.; MORAES, I. M. A.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Uso de leite em pó desnatado não inativado e do leite desnatado UHT na preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Ciência Rural**, Santa Maria, (28):3, p. 467- 470, 1998.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B. M. M.; CELEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Cryopreservation of equine semen: a review. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013.

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

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Extension and storage stallion spermatozoa: a review. **J. Equine Veterinary Science.**, v.7, n.5, p. 289-302, 1987.

PROVINCE, C. A.; SQUIRES, E.; PICKETT, B. W.; AMANN, R. O. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p. 925-934, 1985.

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

SAMPER, J.C. Breeding with cooled transported semen. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 2. ed. Wiley-Blackwell, V.1, cap.128, p.1317. 2011.

SKAIFE, J.B. Evaluation of Semen. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Wiley-Blackwell, V.1, cap.127, p.1285. 2011.

SKAIFE, J. B. Evaluation of Semen. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2. ed. Wiley-Blackwell, V.1, Cap.127, p.1287. 2011.

SIEME, H. Semen Evaluation In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2. ed. Saunders Elsevier, 2009. Cap. 6, p 59.

THACKER, D. L.; ALQUIMIST, J. O. Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility of bovine spermatozoa in boiled milk. **Journal of Dairy Science**, v. 36, p.173-180, 1953.

VIEIRA, M. J.; MATTOS, A. L. G.; MALSCHITZKY, E.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Antimicrobial agents in equine semen extender and its effect on semen characteristics and on pregnancy rates. **Acta Scientiae Veterinariae**. v 30, p. 93-99, 2002.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; MELO, C. M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: are they correlated to semen freezability? **Animal Reproduction Science**. 94, p. 64–66, 2006.