

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP – BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E
RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**Influência da adição de plasma seminal ao sêmen congelado de
jumento (*Equus asinus*) e da lavagem uterina, sobre a
fertilidade de jumentas**

Pedro Victor de Luna Freire Oliveira

Botucatu - SP
Outubro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP – BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E
RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**Influência da adição de plasma seminal ao sêmen congelado de
jumento (*Equus asinus*) e da lavagem uterina, sobre a
fertilidade de jumentas**

Pedro Victor de Luna Freire Oliveira

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal (Área de
Concentração: Reprodução Animal),
como parte das exigências para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu - SP

Outubro/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRE 8/5651

Oliveira, Pedro Victor de Luna Freire.

Influência da adição de plasma seminal ao sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) e da lavagem uterina, sobre a fertilidade de jumentas / Pedro Victor de Luna Freire Oliveira. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa
Capes: 50504029

1. Equídeo. 2. Fecundidade. 3. Citometria de fluxo.
4. Asinino. 5. Preservação do sêmen.

Palavras-chave: CASA; Citometria de fluxo; Equídeos; Sêmen; Teste de fertilidade.

Nome do autor: Pedro Victor de Luna Freire Oliveira

Título: INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE PLASMA SEMINAL AO SÊMEN CONGELADO DE JUMENTO (*Equus asinus*) E DA LAVAGEM UTERINA, SOBRE A FERTILIDADE DE JUMENTAS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Membro

FMVZ – USP – Pirassununga/SP

Data da defesa: 02 de outubro de 2015

DEDICATÓRIA

Essa dissertação é dedicada aos meus pais José Victor de Oliveira e Glauce de Luna Freire Oliveira, pelo exemplo de vida e amor incondicional, sempre incentivando e nunca medindo esforços para o meu aprimoramento profissional.

Ao meu irmão Marcelo de Luna Freire Oliveira, pelo grande companheirismo, amizade, incentivo e risadas, sendo um exemplo de irmandade e de vida que admiro.

Aos meus avós paternos e maternos que não podem mais estar presentes, mas sempre se alegraram por cada conquista de seus netos.

A Deus, pelo seu amor e proteção divina ao longo dessa trajetória.

“Um homem sábio aprende muito mais com seus inimigos do que um tolo com seus amigos”

Frase proferida pelo médico de Niki Lauda em meio a um procedimento doloroso na recuperação de seu grave acidente em 1976. Lauda estava impedido de correr e assistia James Hunt avançar no campeonato

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Titular Frederico Ozanam Papa pelos valiosos ensinamentos, exemplo de profissionalismo, ética e amizade. Grato por acreditar em meu potencial.
- À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Araçatuba, onde me realizei Médico Veterinário e responsável pela base dos meus conhecimentos. E ao campus de Botucatu, pela oportunidade de ingresso na pós-graduação.
- À FAPESP pela bolsa de estudo.
- A Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), pólo Alta Mogiana em Colina/SP, por disponibilizar suas instalações e animais, e principalmente aos funcionários Márcia Ikuma, João Francisco e Edinho pela ajuda e apoio na lida com animais durante o dia e a noite.
- Ao departamento de Radiologia e Reprodução Animal da FMVZ, UNESP – Botucatu/SP, por permitir o uso de suas estruturas e animais.
- Ao Dr. André Maciel Crespilho, pela paciência e amizade durante resolução da estatística.
- Ao Criatório Campeãs da Gameleira (CCG), a M.V. Mariana Herman, consultora e administradora, e todos seus funcionários, pela receptividade e iniciativa louvável de apoio à pesquisa fornecendo suas instalações e animais para o projeto de pesquisa.
- À professora Dr^a Fabiana Ferreira de Souza, pela grande amizade, disponibilizando seu laboratório e as imensas contribuições nas correções e sugestões.
- Ao professor Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior, pelas ideias e auxílio durante a execução do projeto.
- À Dr^a Camila de Paula Freitas Dell’Aqua, na ajuda e valiosas sugestões das análises laboratoriais.
- Às pós-graduandas Yame e Aime, pela disposição e ajuda na coleta de dados durante o experimento.
- Aos pós-graduandos Sidnei, Luís Fernando e Endrigo, pela colaboração no controle das jumentas.

- Aos residentes 2014, Gabriela, Natália, Bertiny e Anne pela contribuição nos procedimentos do experimento.
- Aos amigos do curso de pós-graduação Vitor (Zito), Alexandre (Xandão), Gabriel (Charolês), Júnior, Carol e todos os outros pela convivência e troca de experiências.
- A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude lateral de cabeça
ANOVA	análise de variância
BC	BotuCrio [®]
BS	BotuSpecial [®]
BCF	Frequência de batimento de cabeça
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
COX	Cicloxigenase
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FMVZ	Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - UNESP-Botucatu/SP
G	Força gravitacional
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
h	Hora
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IC	INRA 96 [®] (Rota et al., 2012)
IM	Via intramuscular
IMP	Integridade da membrana plasmática
IN	INRA 96 [®]
IP	Iodeto de propídio
IV	Via intravenosa
Kg	quilograma
L	Lavagem uterina

LIN	Linearidade
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MT	motilidade total percentagem
MP	motilidade progressiva percentagem
MPAI	Integridade de membrana plasmática e acrossomal
mW	Milliwatt
nm	Nanômetro
p	nível de significância
PERO	Peroxidação lipídica
PMN's	Polimorfonucleares
PS	Plasma seminal
RAP	espermatozoides rápidos em percentagem
s	Segundos
sptz	Espermatozoides
STR	Retilinearidade
UI	Unidade Internacional
VAP	velocidade ao longo de uma trajetória média
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva
μ	Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	Porcentagem
10^6	Milhões
10^9	Bilhões
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
®	marca registrada
TM	Trade Mark

Sumário

RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	2
2. REVISÃO DE LITERATURA:	3
2.1 Princípios da congelação do sêmen	3
2.2 Influência do plasma seminal na qualidade do sêmen	7
2.3 Resposta inflamatória uterina	9
2.4. Protocolo de inseminação artificial e ovulação nos asininos	12
3. OBJETIVOS:	14
4. REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 2	20
EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES AO SÊMEN “in natura” E DO PLASMA SEMINAL AUTÓLOGO NA PÓS-DESCONGELAÇÃO DE JUMENTO (<i>Equus asinus</i>)	21
RESUMO	21
1. INTRODUÇÃO	22
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
3. RESULTADOS	33
4. DISCUSSÃO	37
5. REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 3	51
INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DILUIDORES DE CONGELAÇÃO, DO PLASMA SEMINAL E DA LAVAGEM UTERINA SOBRE A FERTILIDADE DE JUMENTAS (<i>Equus asinus</i>)	52
RESUMO	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	56

3. RESULTADOS	62
4. DISCUSSÃO	64
5. REFERÊNCIAS	67

RESUMO

OLIVEIRA, P.V.L.F. **Influência da adição de plasma seminal ao sêmen congelado de jumento (*Equus asinus*) e da lavagem uterina, sobre a fertilidade de jumentas.** Botucatu – SP. 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição do plasma seminal autólogo ao sêmen criopreservado de jumentos, aliado a lavagem uterina pós-inseminação artificial influencia nos índices de fertilidade em jumentas. Para isso, dois experimentos foram realizados: No experimento I foram analisados os parâmetros de cinética espermática pelo método computer assisted sperm analysis (CASA), análise da integridade de membrana plasmática e acrossomal (MPAI), peroxidação lipídica (PERO) e teor de espécie reativa de oxigênio intracelular (EROS) pela técnica de citometria de fluxo, de 15 ejaculados de 3 jumentos, diluídos em INRA-96[®] (IC - INRA, IMV Technologies, France) - Rota et al., (2012) ou em BotuCrio[®] (BC - Botupharma, Botucatu, Brasil), com e sem adição de plasma seminal (PS) após a descongelação. Os resultados do CASA foram semelhantes para os 2 diluentes ($P>0,05$), no entanto o BC proporcionou uma maior integridade de MPAI além da PERO menor que o IC, resultando em menor EROS ($P<0,05$). A adição do PS reduziu os parâmetros do CASA ($p<0,05$), porém sem ação na MPAI e PERO ($p>0,05$). No experimento II, avaliou-se a influência da adição do PS autólogo na pós-descongelação e sua associação à lavagem uterina (L) pós-inseminação artificial (IA), na fertilidade de jumentas. Foram utilizados 86 ciclos de 33 jumentas, divididas em 8 grupos: G1) BC + PS + L e G2) IC + PS + L foram testados mediante inseminações em 14 ciclos cada; G3) BC + L e G4) IC + L foram testadas em 11 ciclos cada, todas as L foram feitas 10 horas após a IA; G5) BC + PS e G6) IC + PS foram empregados em 8 ciclos cada, e o G7) BC e G8) IC foram avaliados em 10 ciclos cada. Verificou-se que o PS não influenciou na fertilidade de jumentas ($p = 0,6582$) contudo a L, 10 h pós-IA, interferiu positivamente na taxa de prenhez ($p = 0,0097$) elevando de 0% (G7 e G8) para 42,9% (G1 e G2).

Palavras chave Equídeos; Sêmen; Teste Fertilidade; CASA; Citômetro de fluxo

ABSTRACT

OLIVEIRA, P.V.L.F. **Influence of the addition of seminal plasma to jack frozen semen (*Equus asinus*) and uterine lavage, on jenny fertility.** Botucatu – SP, 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The aim of this study was to evaluate whether the addition of autologous seminal plasma to frozen donkey semen, coupled uterine flushing after artificial insemination influence on fertility rates in jennies. Two experiments were conducted: experiment I, the parameters of sperm kinetics were analyzed by using computer assisted sperm analysis (CASA), analysis of plasma membrane integrity and acrosome (MPAI), lipid peroxidation (PERO) and reactive species content intracellular oxygen (ROS) by the technique of flow cytometry, 15 ejaculated 3 donkeys, diluted in INRA-96® (IC - INRA, IMV Technologies, France) -. Rota et al, (2012) or BotuCrio® (BC - Botupharma, Botucatu, Brazil), with and without addition of seminal plasma (SP) after thawing. The results were similar for CASA to 2 extenders ($P > 0.05$), however BC provided greater MPAI integrity beyond smaller PERO than the IC, resulting in lower EROS ($P < 0.05$). The addition of PS reduced the parameters of CASA ($P < 0.05$), but no action on the MPAI and Pero ($P > 0.05$). Experiment II, evaluated the influence of the addition of autologous SP in post-thaw and its association with uterine lavage (L) pos-IA, in the fertility jennies. 86 cycles of 33 jennies were used, divided into 8 groups: G1) BC + SP + Land G2) IC + SP + L, were tested by 14 cycles each; G3) BC+L and G4) IC+ L, were tested on each 11 cycles, all L were made 10 hours after AI; G5) BC + SP and G6) IC + SP were used in 8 cycles each, and the G7) BC and G8) IC were evaluated in 10 cycles each. It was found that the SP, had no effect on fertility jennies ($p = 0.6582$) however L 10 h post-IA, increased pregnancy rate ($p = 0.0097$) increasing from 0% (G7 and G8) to 42.9% (G1 and G2).

Keywords: Equidaeae; Semen; Fertility Test; CASA; Flow Cytometer.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em divulgação da última “Produção da Pecuária Municipal 2012”, informou que o rebanho de asininos (*Equus asinus*) e muares (*Equus mulus*) teve uma redução de 7,4% e 3,8%, respectivamente no total de número de animais em comparação ao ano de 2011, sendo a região Nordeste a maior concentração desses animais.

Contudo, segundo o próprio Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2014, o agronegócio representa cerca de 1/3 de todo Produto Interno Bruto (PIB) do país, e a pecuária representa cerca de 30% de todo agronegócio, se tornando um grande destaque pela sua importância na economia brasileira. Os eqüídeos assumem sua relevância frente a isso, uma vez que Confederação de Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), 2004 relata que os animais desse gênero possuem uma correlação de existência de 0,74 com a espécie bovina.

Com o propósito de melhorar a situação da espécie asinina (*Equus asinus*), a aplicação de inseminação artificial (IA) com sêmen congelado poderia contribuir para a sobrevivência de raças em perigo de extinção. Essa ferramenta da biotecnologia é considerada como uma das mais usadas e de maior impacto na reprodução animal, possibilitando uma melhor distribuição de genes e o desenvolvimento de planos de melhoramento adequados, reduzindo os riscos de endogamia excessiva em pequenas populações (Rota et al., 2008). Outra possibilidade do uso de sêmen congelado é a preservação de material genético por um vasto período de tempo, além da gama de benefícios a partir da possibilidade de perpetuá-lo, promovendo assim a diversidade genética para o futuro (Rota et al., 2008).

Há diversas pesquisas concluídas e outras em andamento na área de biotecnologia reprodutiva na espécie equina (*Equus caballus*) (Andrade et al., 2012; Arruda et al., 2011; Guasti et al., 2012; Love 2011).

No entanto, o processo de criopreservação espermática na espécie asinina possui dificuldades (Watson, 2000). Além disso, os relatos unânimes de baixos índices de prenhez alcançados nesta espécie com sêmen congelado (Oliveira et al., 2006a; Rota et al., 2008; Vidament et al., 2009). Contudo, estudos têm tentado melhorar esses parâmetros com adição do plasma

seminal e/ou lavagem uterina pós-inseminação (Rota et al., 2012) a fim de reduzir a resposta inflamatória pós-inseminação artificial (Sabatini et al., 2014). Entretanto, Wildt et al., (1995) afirmaram que a simples transferência de tecnologias desenvolvidas em uma espécie para outras, muitas vezes produziram em resultados insatisfatórios, pois contrasta com as diferenças fisiológicas entre as espécies.

Em asininos as observações dos efeitos pós-cobertura no endométrio são ainda pequenas (Miró et al., 2013; Oliveira 2005; Rota et al., 2012; Vilés et al., 2013). Embora Vilés et al., 2013 levanta a hipótese que a resposta inflamatória uterina é uma das principais causas da redução da taxa de prenhez em jumentas inseminadas com sêmen congelado.

Assim, pesquisas ligadas ao aperfeiçoamento das técnicas que utilizam inseminações artificiais com sêmen criopreservado em asininos devem ser incentivadas, no intuito de melhorar e investigar as peculiaridades reprodutivas nessa espécie, além de ajudar a sobrevivência de raças em perigo de extinção.

Objetivo do presente estudo foi avaliar os parâmetros seminais, e os índices de fertilidade utilizando-se dois diluentes comerciais com ou sem a adição do plasma seminal ao sêmen criopreservado de jumentos. Associado a isso, verificar o efeito da lavagem uterina pós-inseminação artificial.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1 Princípios da congelação do sêmen

Os processos da criopreservação envolvendo resfriamento, congelação e descongelação, causam sérias mudanças prejudiciais ao espermatozóide (Watson, 1981). Esses efeitos são causados pela crio-injúria, resultando na desestabilização das membranas espermáticas e comprometem a função dos espermatozoides (Muiño-Blanco et al., 2008).

Vários autores relatam resultados insatisfatórios de fertilidade com a utilização de sêmen criopreservado na espécie asinina (Trimeche et al., 1998; Oliveira et al., 2006a; Rota et al., 2008). Porém, Rota et al., (2012), divulgaram índice notável de 61,5% (8/13) de prenhez em jumentas utilizando sêmen congelado.

A proporção de células que sobrevivem ao protocolo de criopreservação, é determinado pela sensibilidade dos espermatozoides a refrigeração, ao estresse osmótico e à adição de crioprotetores, podendo esses fatores serem os três principais pontos críticos (Watson, 2000). O primeiro deles é a mudança de temperatura, em que o choque térmico induz graves lesões celulares devido a uma rápida queda de 18°C a 7°C, passando do estado líquido para um estado gelatinoso, e ainda pela formação de cristais de gelo (Watson, 2000), sendo as lesões causadas por danos nas membranas (Drobnis et al.1993). Serres et al., (2002), observaram através de teste hiposmótico, que o armazenamento de sêmen de jumento a 4°C causou mais danos à membrana plasmática do que quando armazenados a 15°C, porém ambas as temperaturas não influenciaram nos parâmetros de motilidade total e progressiva.

O segundo ponto crítico é o estresse osmótico e o efeito tóxico causado pela exposição às concentrações molares dos crioprotetores, principalmente o glicerol (Storey et al., 1998 e Watson, 2000), resultando na utilização de alguns outros compostos crioprotetores, não comumente utilizados para crioproteção dos espermatozoides, como o dimetil sulfoxido (Storey et al., 1998).

Por último a formação e dissolução de gelo no meio intracelular, causando tanto uma perda na viabilidade espermática, quanto uma diminuição da função de espermatozoides sobreviventes constituem o terceiro ponto crítico da criopreservação de sêmen (Watson, 2000). No entanto, o mecanismo de ação dos crioprotetores não está bem compreendido, Watson (2000) sugere que estas substâncias atuem através de propriedade coligativa com a água. Uma propriedade coligativa é a diminuição do ponto de congelação de uma solução. Estes compostos modificam a característica da molécula da água, reduzindo a formação de cristais de gelo, atuando como solvente e diminuindo a concentração de solutos no meio externo à célula (Watson 2000).

De acordo com Loomis et al. (2008), os princípios básicos da criopreservação de células espermáticas incluem:

1. Mudanças físicas nas membranas celulares quando a célula é refrigerada abaixo da temperatura de fase de transição, mudando de um estado líquido cristalino para um estado gelatinoso, podendo levar ao choque frio e danos de refrigeração.

2. Alteração do metabolismo celular com a temperatura, pois o metabolismo celular é reduzido pela metade a cada diminuição de 10°C. Portanto, quando o ejaculado do garanhão é reduzido a partir da temperatura corpórea (39°C) para 5°C, o metabolismo dos espermatozóides é reduzido para cerca de 10% do nível original, levando ao cessamento do metabolismo quando armazenadas em nitrogênio líquido.
3. Aumento da sobrevivência celular com a adição de crioprotetores, protegendo-a dos danos da congelação. Uma vez que crioprotetores penetrantes, tais como glicerol, agem tanto como um solvente como um soluto no meio; já os crioprotetores não penetrantes, atuam puramente como um soluto. No entanto, quando adicionados ou removidos, os dois tipos de crioprotetores induzem alterações celulares de volume que podem danificar as células.
4. Danos às células que são congeladas. Quando a água externa congela, os solutos se concentram. As células permanecem nestes canais não congelados, até quando estes canais são expostos às condições hiperosmóticas, causando a perda de água de tal forma que as células se desidratam. Quando a temperatura cai suficientemente, os canais não congelados vitrificam, ao mesmo tempo em que a maioria dos processos bioquímicos e biofísicos cessam, sendo que a velocidade da queda de temperatura determina a extensão e duração da desidratação celular e a hipertonidade ao qual as células são expostas.
5. Retorno da normalidade da osmolaridade e tamanho celular após a descongelação. Sendo que a extensão da expansão das células e a duração dependem da quantidade do crioprotetor e a taxa de difusão do crioprotetor na membrana.

De maneira geral, o resultado da criopreservação é uma perda na viabilidade espermática ou uma diminuição da função dos espermatozóides sobreviventes (Watson, 2000).

2.1.1 Congelação de sêmen asinino

Trimeche et al., (1998) demonstraram que o glicerol, o crioprotetor mais comumente utilizado para criopreservação de sêmen de cavalos (*Equus caballus*), pode ser tóxico para o sêmen de jumentos, ou exercer um efeito negativo na fertilidade dos asininos, também verificado por Vidament et al. (2009) e Pace et al., (1975), que observaram este mesmo efeito em sêmen de equinos. Parece plausível, a suposição do efeito deletério do glicerol sobre o trato genital de jumentas, pois as taxas de prenhez são maiores em éguas quando comparadas às jumentas na utilização de IA de sêmen congelado de jumentos (Vidament et al., 2009). O estudo de Vidament et al., (2009) constatam que o aumento da concentração de glicerol (0; 2,2; 3,5 e 4,8%) antes da refrigeração do sêmen de jumento resultou em decréscimo proporcional nas taxas de prenhez de éguas (87, 53, 53 e 13%, respectivamente), no entanto a adição de 2,2% de glicerol no sêmen refrigerado de jumento resultou em nenhuma prenhez em jumentas. Oliveira et al. (2006a) observaram resultados satisfatórios de prenhez em éguas (40%) quando o glicerol foi usado como crioprotetor em sêmen congelado de asinino. Porém, os índices foram insatisfatórios em jumentas na utilização desse mesmo crioprotetor (Vidament et al., 2009) ou outros crioprotetores (dimetil sulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida) também foram adotados (Oliveira et al., 2006a). Todavia, com o emprego de sêmen resfriado de jumento, Vidament et al., (2009) conseguiram 67% de prenhez utilizando 2% de dimetilformamida, mas apenas 11% de prenhez com sêmen descongelado utilizando o mesmo crioprotetor.

Rota et al., (2012) avaliaram parâmetros seminais comparando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol em diferentes concentrações (2,2% e 1,4% respectivamente), mas em concentração molar semelhante, aproximadamente 0,26 M, e não constataram diferença significativa após a descongelação na motilidade total, motilidade progressiva e velocidade espermática, constatando que ambos os crioprotetores podem igualmente ser utilizados na criopreservação de sêmen asinino. Porém, o índice de prenhez em jumentas foi maior para o grupo que utilizou glicerol.

Rota et al. (2008) demonstraram também que a diluição do ejaculado de jumento em INRA82 (IMV Technologies, France) com 2% de gema de ovo

mantendo-se concentração de 20×10^6 espermatozoides/ml apresentou melhor motilidade após 72h quando comparado às amostras em que o plasma foi retirado após centrifugação em $700 \times g$ por 10 minutos e ressuspensos no diluente, mantendo-se a mesma concentração. Resultado não repetido, posteriormente, pelo mesmo autor (Rota et al., 2012) com sêmen congelado, nas quais a re-diluição das doses descongeladas com diluente não apresentaram melhoras na cinética espermática, porém sem diferenças estatísticas. Neste estudo, também foi observado que logo após a descongelação e re-diluição com plasma seminal, houve diminuição da motilidade total, motilidade progressiva e velocidade de trajeto, quando comparado com grupo descongelado e re-diluição com INRA-96.

2.2 Influência do plasma seminal na qualidade do sêmen

O plasma seminal de mamíferos é uma secreção fisiológica da rede testis, epidídimos e glândulas acessórias do trato reprodutor masculino (Troedson et al., 2005), que desempenha um papel importante na maturação final dos espermatozoides, através de eventos hormonais, enzimáticos e modificação de superfície, funcionando como um veículo para os espermatozoides (Mann, 1978). Os componentes orgânicos no plasma seminal são essenciais para manutenção do metabolismo, pH e osmolaridade espermática e as proteínas são a contribuição mais importante para a função desta célula em mamíferos (Maxwell et al., 2007).

O papel do plasma seminal na função do espermatozoide de mamíferos permanece em grande contradição no meio científico. Ambos os efeitos, inibitórios e estimulatórios, à função celular foram relatados (Muiño-Blanco et al., 2008). Contudo, Muiño-Blanco et al., (2008), afirmaram que a adição de proteínas do plasma seminal nos espermatozoides antes e/ou após a refrigeração do sêmen, é capaz de minimizar os efeitos da crioinjúria. Esses autores observaram que o sêmen de carneiro é um dos mais sensíveis à frio temperaturas dentre as espécies domésticas. No entanto, as principais proteínas do plasma seminal do carneiro são capazes de proteger e reparar danos causados por essas temperaturas, sendo os mesmos achados de Maxwell et al. (2007) em que observaram melhoras nos parâmetros de

motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e atividade mitocondrial, quando adicionado plasma seminal de carneiro em amostras de sêmen descongelado.

Entretanto, a adição de 70% de plasma seminal em amostras descongeladas de sêmen de jumento (adição de 350 µl de plasma seminal autólogo em 150 µl de sêmen a 168×10^6 sptz/ml) promoveu o decréscimo de todos os parâmetros de cinética espermática avaliados, e esse efeito prejudicial foi observado até 2 horas pós-descongelação (Sabatini et al., 2014). Contudo, em outro grupo experimental, os autores relataram que o acréscimo de 20% de plasma seminal (172 µl de plasma seminal autólogo em 434 µl de sêmen a 100×10^6 sptz/ml) causou efeitos deletérios na membrana plasmática, gerando baixos valores de integridade da membrana plasmática e teste hiposmótico (HOS+).

Aurich et al., (1996) constataram que a adição de 30% de plasma seminal de garanhões resistentes ao processo de congelação (motilidade progressiva do sêmen descongelado $\geq 30\%$), aumentou os parâmetros de motilidade progressiva e integridade de membrana de garanhões considerados sensíveis à criopreservação de sêmen (motilidade progressiva após descongelação $\leq 20\%$). O contrário também foi constatado, ou seja, a adição de 30% de plasma seminal de garanhões sensíveis à criopreservação em amostras descongeladas de garanhões resistentes ao processo ocasionou piora nos parâmetros de motilidade progressiva, porém não alterou a integridade de membrana.

A centrifugação a 400 x g por 7 minutos com posterior remoção do plasma seminal teve um efeito positivo na motilidade e integridade na membrana plasmática de espermatozóides de jumentos refrigerados e ressuspendidos a 50×10^6 sptz/ml (Serres et al., 2002).

Troedsson et al., (2005) *in vitro* concluíram que os componentes do plasma seminal desempenham papéis importantes no transporte e na sobrevivência de espermatozóides viáveis no trato reprodutivo feminino e na eliminação dos espermatozóides não viáveis do útero, sendo o plasma seminal responsável pela opsonização do espermatozóide e bloqueio da fagocitose. Já Robertson, (2007) afirmou que o plasma seminal não é necessário para a fertilização, porém é um meio que facilita as interações entre o útero e os gametas masculinos, maximizando assim a probabilidade de concepção.

Apesar de diversos autores relatarem os benefícios proporcionados pelo plasma seminal durante a cobertura, sua real função é discutível, uma vez que trabalhos utilizando espermatozóides da cauda do epidídimo acrescido ou não de plasma seminal não apresentaram diferenças nas taxas de concepção em eqüinos (Monteiro, 2013). Ainda, o mesmo autor relatou em seu experimento, que os espermatozóides do epidídimo após descongelação apresentaram superioridade nos parâmetros de cinética e viabilidade espermática, além de melhor fertilidade, em comparação ao ejaculado (Monteiro, 2013).

Estes resultados contraditórios de diversos trabalhos indicam que o plasma seminal é uma mistura complexa que contém uma grande variedade de componentes que podem afetar a função espermática, e que a diferença pode estar relacionada com a variabilidade que existe na composição do plasma seminal entre ejaculados (Muiño-Blanco et al., 2008).

O estresse oxidativo é uma condição associada com aumento da produção de radicais livres de oxigênio, comumente conhecido Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e acredita-se que elas estão na base da etiologia de inúmeras disfunções celulares, sendo os espermatozóides de mamíferos capazes de gerar naturalmente EROS e afetar negativamente a função espermática (Agarwal & Saleh, 2002).

Andrade et al., (2012) descreveram que embora o plasma seminal contenha mecanismos antioxidantes que impedem os efeitos nocivos do EROS, isto não faz reduzir a peroxidação das membranas espermáticas, uma vez que EROS, provavelmente, estão relacionados com o processo de criopreservação, sendo que Wang et al., 1997 relataram aumento significativo de EROS durante este processo.

Porém, Andrade et al., (2012), concluíram que, em geral, a peroxidação das membranas espermáticas aumentaram durante o período de incubação, independentemente se o sêmen é proveniente de garanhão com alta ou baixa fertilidade.

2.3 Resposta inflamatória uterina

A resposta inflamatória uterina é desencadeada pelos espermatozóides e outros componentes do sêmen, iniciando-se normalmente dentro de 1 hora

da inseminação, atingindo picos em 6-12 horas e, finalmente, diminuindo após 24-36 h em éguas (Troedsson et al., 2001). Segundo Vilés et al., (2013) a resposta inflamatória uterina é hipotetizada como uma das principais causas da menor taxa de prenhez em jumentas utilizando-se sêmen congelado.

Segundo Vilés et al., (2013) quando as células epiteliais do colo uterino e do endométrio entram em contato com o sêmen, citocinas pró-inflamatórias, tais como as prostaglandinas são produzidas, principalmente através da ação da enzima Ciclooxigenase-2 (COX-2) na síntese da cascata do ácido araquidônico.

Com intuito de observar os efeitos da adição do plasma seminal ao sêmen asinino descongelado sobre a reação inflamatória uterina de jumentas, Rota et al., (2012) realizaram dois lavados uterinos por ciclo (6 e 10h após as inseminações) com 1L de Ringer com Lactato em cada lavado e constataram que o grupo inseminado com re-diluição do plasma seminal obteve uma concentração maior de polimorfonucleares (PMN's) em seus lavados recuperados, quando comparados com o grupo que não recebeu re-diluição alguma após a descongelação.

Troedsson et al., (2001) sugeriram que a presença de bactérias ou produtos inflamatórios é incompatível com a sobrevivência do embrião, caracterizado pela ocorrência de um influxo de neutrófilos, no entanto, útero de éguas saudáveis devem ser capazes de eliminar espontaneamente a inflamação nos cinco primeiros dias após a cobertura. Além dos espermatozóides provocarem quimiotaxia de PMN's, sendo esse acontecimento um fato fisiológico e necessário para limpar o útero do excesso de espermatozóides e plasma seminal. Contudo, Troedsson et al., (2005), observaram que a presença do plasma seminal diminui drasticamente a fagocitose de espermatozóides opsonizados.

Troedsson et al., (2001) também constataram que éguas inseminadas com sêmen descongelado, onde praticamente todo o plasma seminal foi removido, desenvolveram uma acentuada e prolongada endometrite pós-cobertura. Com isso, os autores sugeriram que o plasma seminal modula a resposta inflamatória uterina e pode, também, diminuir a opsonização do espermatozóide, de forma que a inseminação com sêmen congelado pode induzir uma maior resposta inflamatória e acúmulo de líquido, quando

comparado com coberturas utilizando sêmen fresco ou monta natural.

Rota et al., (2012) observaram que as jumentas que apresentaram maior proporção de PMN's após inseminação, foi do grupo glicerol ressuspendido com plasma seminal.

No estudo de Troedsson et al., (2001) avaliando a relação da resposta inflamatória pós-cobertura com sêmen contendo ou não plasma seminal (substituído por diluente comercial), observaram que ao utilizar o plasma seminal na inseminação, a duração da inflamação uterina foi menor após inseminação e ocorreu diminuição de PMN's recuperados do útero 24h após a cobertura quando comparados aos momentos 6-12h após inseminação. Essa redução da resposta inflamatória não foi observada no grupo contendo somente diluente comercial. Fato, no entanto, contrário na espécie asinina, demonstrado por Rota et al., (2012) e Vilés et al., (2013) em que no primeiro estudo foi observado que o sêmen descongelado re-diluído com diluente comercial INRA96®, apresentou concentração estatisticamente menor de PMN's tanto 6 e 10h após a inseminação, quando comparado com o grupo que recebeu re-diluição com plasma seminal. No segundo estudo a presença de plasma seminal não alterou a quantidade PMN's quando comparado à inseminação com sêmen descongelado sem adição do plasma seminal.

Porém, Miró et al., (2013) constataram que a presença do plasma seminal em amostras de sêmen fresco de jumentos foi responsável pela redução da resposta inflamatória, devido a observações *in vitro* de supressão da ligação dos espermatozóides com PMN's. Também, Rota et al., (2012) com sêmen congelado de asinino, relataram taxas maiores de prenhez (61,5%; 8/13) na mesma espécie, no grupo inseminado re-diluído com plasma seminal, contra o grupo que foi inseminado sem re-diluição (20%).

Vilés et al., (2013) observaram grande concentração de COX-2 no útero de jumentas inseminadas com sêmen congelado asinino sem adição de plasma seminal, quando comparada aos grupos que não foram inseminadas ou que foram inseminadas com acréscimo de plasma seminal. Esse resultado sugere que em éguas e jumentas, o plasma seminal em vez de exercer um efeito direto sobre a infiltração precoce de PMN, apenas encurta o período de inflamação por bloquear a síntese de prostaglandinas e a quimiotaxia de PMN, reduzindo a amplitude dos sinais primários de inflamação, como ocorre após a

administração de inibidores da COX-2.

Medicamentos ecbólicos e lavados uterinos são tratamentos mais comuns para inflamação pós-cobertura em éguas (Leblanc, 2010). Troedsson et al., (2005) afirmaram que o plasma seminal de garanhões é responsável por contrações uterinas benéficas para os espermatozóides dentro do trato reprodutivo da égua, por possuir níveis de Prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) e PGE resultando em contrações do miométrio. Segundo Rota et al., 2012 a lavagem uterina em jumentas após as inseminações com sêmen congelado pode ter influência nas taxas de prenhez em seu experimento, de forma que novas pesquisas são necessárias para confirmar essa hipótese

2.4. Protocolo de inseminação artificial e ovulação nos asininos

A obtenção de conceito por meio da inseminação artificial com sêmen congelado em jumentas é muito mais raro do que em éguas (Vilés et al., 2013). Nesta espécie, as boas taxas de prenhez são geralmente obtidas quando utilizado sêmen fresco ou refrigerado, mas podem ser muito insatisfatórias com o emprego de sêmen criopreservado (Vidament et al., 2009 e Oliveira et al., 2011).

Após a inseminação artificial (IA), o sêmen é exposto a uma série de ambientes distintos que alteram significativamente o número e a função espermática (Arruda et al., 2011). O protocolo de inseminação artificial com sêmen congelado em equinos mais amplamente aceito, com baixos custos e bons resultados envolve duas inseminações às 24 e 40h após a indução ovulatória com Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) ou acetato de deslorelina em éguas com folículos pré-ovulatórios (Loomis et al., 2008). Devido à reduzida longevidade espermática no trato genital feminino, Pace et al. (1975) recomendaram que a IA em éguas com sêmen criopreservado de garanhões deve ser realizada no intervalo ideal em que a fertilidade é considerada máxima, 12 horas antes e 6 horas após a ovulação.

Em jumentas a IA com sêmen congelado tem sido descrita em trabalhos nos quais são sugeridos a realização da IA antes (Trimeche et al., 1998) e/ou após a detecção da ovulação (Oliveira et al., 2006a), com doses inseminantes variando de 500×10^6 sptz (Rota et al., 2012) a 800×10^6 sptz (Oliveira et al.,

2006).

A concentração espermática da dose inseminante, para sêmen fresco, é fator importante para gestação em jumentas. Para obter taxas de gestações semelhantes entre éguas e jumentas, Oliveira et al. (2006b) necessitaram usar o dobro de células espermáticas móveis na inseminação de jumentas (1×10^9) quando comparadas às éguas (500×10^6). Apesar disso, sabe-se que poucos espermatozoides (1.000 a 10.000) terão acesso ao oviduto, e esse fato é resultado de uma seleção espermática que ocorre durante o transporte uterino (PARKER et al., 1975).

Em seu experimento, Rota et al., (2012) relataram que a ovulação das jumentas foram induzidas quando apresentavam comportamento de estro e maior folículo com diâmetro de 32 mm, com 2000 UI de hCG IV, ou com 6,3 mg de acetato de buserelina.

Carluccio et al., (2007) relataram que tanto a indução com hCG, quanto como análogo de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), Lecirelin, foram eficazes na indução da ovulação de jumentas e os tempos médios para resposta da ovulação foram 43h para o grupo que utilizou análogo do GnRH e 42h para o grupo que utilizou hCG. Neste último grupo observou-se maior eficiência (100%) quando as jumentas foram induzidas com diâmetro de folículo entre 36-40 mm. Os mesmos autores também alertaram para o risco de diminuição na resposta da indução da ovulação em jumentas com hCG em tratamentos sucessivos, devido a possível formação de anticorpos.

3. OBJETIVOS:

- 3.1- Comparar a eficiência de dois diluentes comerciais, INRA[®](IMV Technologies, France) e BotuCrio[®] (Botupharma, Botucatu, Brasil), sobre as características seminais de sêmen de jumentos pós-descongelação;
- 3.2- Observar os efeitos de plasma seminal autólogo sobre os parâmetros espermáticos após a descongelação;
- 3.3- Analisar o efeito do acréscimo de plasma seminal após a descongelação sobre os índices de prenhez em jumentas;
- 3.4- Verificar a influência da lavagem uterina pós-cobertura sobre a taxa de prenhez em jumentas

4. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male in fertility: rationale, significance and treatment. *Urol Clin North Am* 29, p. 817–827, 2002.
- ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; MERIGHE, G.K.F.; NASCIMENTO, J.; TARRAGO, O.F.B.; MEIRELLES, F.V.; ARRUDA, R.P. Relation between tyrosine phosphorylation of the equine sperm surface proteins and acrosome reaction. *Anim Reprod Sci.*;107, p. 304 –305, 2008.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA L.Z; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p. 145-151. 2011.
- AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology* 46, p. 791–797.1996.
- CARLUCCIO, A.; PANZANI, S.; TOSI, U.; FAUSTINI, M.; De AMICIS, I.; VERONESI, M.C. Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. *Theriogenology* 68, p. 914–919, 2007.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo / Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, Brasília: CNA, 2004. 68p. (Coletânea Estudos Gleba; 39).
- DROBNIS E.Z.; CROWE L.M.; BERGER T.; ANCHORDOGUY T.J.; OVER-STREET J.W.; CROWE J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes – a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265, p. 432–437. 1993.

- GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; LISBOA, F.P.; PAPA, F.O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction, Animal Reproduction. October p. 17-20, 2012.
- LeBlanc MM. Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod Domest Anim* 45(Suppl 2), p. 21–27. 2010.
- LOOMIS P.R.; GRAHAM J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science* 105, p. 119–128, 2008.
- LOVE, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology* 76, p. 547-557, 2011.
- MANN T. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. *Int J Fertil* 23, 133–137. 1978.
- MAXWELL WMC, DE GRAAF SP, GHAOUI RE-H, EVANS G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64, p. 13–38, 2007.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA), <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/12/produto-interno-bruto-da-agropecuaria-deve-ser-de-rs-1-trilhao>, 2014, acessado em 11/08/2015.
- MIRÓ, J.; VILÉS, K.; GARCÍA, W.; JORDANA, J; YESTE, M. Effect of donkey seminal plasma on sperm movement and sperm - polymorphonuclear neutrophils attachment *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 140, p. 164-172. 2013.

- MONTEIRO, G.A. Criopreservação e fertilidade de espermatozóides do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis. 2013. 263 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2013.
- MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ J.A. Review Article: Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim* 43 (suppl. 4), p. 18-31. 2008.
- OLIVEIRA J.V. Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumento (*equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade. Botucatu, 2005, Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, 2005.
- OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M; MACEDO, L.M.; DELL'AQUA Jr, J.A.; PAPA, F.O. Effect of cryoprotectant on donkey sêmen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science* 94, p. 82-84, 2006a.
- OLIVEIRA, J.V.; PAPA, F. O.; MONTEIRO, J.; MARINI, C.; ALVARENGA, M. Nascimento do primeiro jumento a partir de espermatozói descongelados no Brasil. In: Proceedings of the XII ABRAVEQ Annual Conference, Campinas, Sao Paulo, Brasil. The Brazilian Association of Equine Practitioners, p. 203. 2011.
- OLIVEIRA, J.V.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARNO, M.A.; ARAÚJO, G,H,M; SANTOS, J.F. Comparação entre diferentes concentrações de sêmen fresco de jumento (*Equus asinus*) para inseminação artificial de jumentas. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (Suplemento 1): 2006b.
- PACE M.M.; SULLIVAN J.J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. *J Reprod Fertil Suppl* 23, p.115–121, 1975.

- PARKER, W.G., SULLIVAN, J.J., FIRST, N.L. Sperm transport and distribution in the mare. J. Reprod. Fertil., v.23, p. 63-66, 1975.
- Produção da Pecuária Municipal 2012, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Prod. Pec. munic., Rio de Janeiro, v. 40, p. 1-71, 2012.
- ROBERTSON, S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. J. Anim. Sci. 85, p. 36–44. 2007.
- ROTA, A; MAGELLI, C; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. Theriogenology 69, p. 176-185, 2008.
- ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI C.; CAMILO, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. Theriogenology 78, p. 1846–1854, 2012.
- SABATINI, C.; MARI, G.; MISLEI, B.; LOVE C.C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; ROTA, A. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. Reprod Dom Anim 49, p. 989-994. 2014.
- SERRES C.; RODRIGUEZ A.; ALVAREZ A.L.; SANTIAGO, I.; GABRIEL, J., GÓMEZ-CUÉTARA, C.; MATEOS, E. Effect of centrifugation and temperature on motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. Theriogenology 58, p. 329–332. 2002.
- STOREY, B.T., NOILES, E.E., THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology 37,p. 46–58. 1998.
- TRIMECHE A; RENARD P; TAINTURIER D; A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. Theriogenology50, p. 793– 806, 1998

- TROEDSSON, M.H.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Compnents in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 89, p. 171-186. 2005.
- TROEDSSON M.H.; LOSET K.; ALGHAMDI A.M.; DAHMS B.; CRABOB.G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci* 68, p. 273–8. 2001
- VIDAMENT, M; VINCENT, P; MARTIN, F.X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci* 112, p. 22–35, 2009.
- VILÉS, K.; RABANAL, R.; RODRÍGUEZ-PRADO, M.; MIRÓ, J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science* 143, p. 57-63. 2013.
- WATSON P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Clarke A (ed.), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press, London, p. 189–218, 1981.
- WATSON P.F.; GREEN C.E. Cooling and capacitation of boar spermatozoa: what do they have in common? *Boar Semen Preservation*, Vol. IV, p. 53–60, 2000.
- WILDT D.E.; PUKAZHENTI B.; BROWN J.; MONFORT S.; HOWARD J.G.; ROTHT. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. *Reprod Fertil Dev* 7, p. 811–824, 1995.

CAPÍTULO 2

**EFEITO DE DIFERENTES DILUIDORES AO SÊMEN “in natura” E DO
PLASMA SEMINAL AUTÓLOGO NA PÓS-DESCONGELAÇÃO DE
JUMENTO (*Equus asinus*)**

Artigo redigido segundo as normas da Animal Reproduction Science, ISSN 0378-4320, ranqueada como A2, pelo QUALIS – CAPES de 2015.

RESUMO

Apesar da criopreservação espermática apresentar índices satisfatórios de fertilidade para a espécie equina (*Equus caballus*), esses resultados ainda não foram reproduzidos para a espécie asinina (*Equus asinus*) com uso dessa biotecnologia. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a criopreservação espermática de jumentos em INRA-96® (INRA, IMV Technologies, France) modificado por Rota et al., 2012 ou BotuCrio® (Botupharma, Botucatu, Brasil), com e sem adição de plasma seminal após a descongelação. Nesta pesquisa, para efeito de avaliação de qualidade espermática utilizou-se a cinética espermática pelo método de análise espermática computadorizada (computer assisted sperm analysis, CASA), integridade de membrana plasmática em microscopia de epifluorescência e integridade de membrana plasmática e acrossomal (MPAI), peroxidação lipídica (PERO) e teor de Espécies Reativas ao Oxigênio (EROS) intracelular pela técnica de citometria de fluxo de 15 ejaculados de 3 jumentos. Nesse estudo foi constatado superioridade estatística para o diluente BotuSpecial® (Botupharma, Botucatu, Brasil) nos parâmetros de cinética espermática em MP, VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN, e a similaridade entre os diluentes de

criopreservação BotuCrio® e INRA-96® modificado, porém o BotuCrio® teve MPAl superior e PERO menor que o outro diluente, além de resultar em menor EROS. Também foi constatado o efeito deletério dos parâmetros da cinética espermática, quando adicionado o plasma seminal autólogo nas doses descongeladas, porém essa adição não foi prejudicial para MPAl e PERO, segundo a técnica de citometria de fluxo.

Palavras-chave: CASA, citometria de fluxo, criopreservação, jumento, plasma seminal, sêmen.

1. INTRODUÇÃO

Há diversas pesquisas concluídas e outras em andamento na área de biotecnologia reprodutiva na espécie equina (*Equus caballus*) (Andrade et al., 2012; Arruda et al., 2011; Guasti et al., 2012; Love 2011).

Resultados satisfatórios com o emprego de sêmen congelado na espécie eqüina têm sido relatados (Bedford-Guaus, 2007; Loomis et al., 2005; Avanzi et al., 2015). Entretanto, Wildt et al., (1995) afirmaram que a simples transferência de tecnologias desenvolvidas em uma espécie para outras, muitas vezes produziram em resultados insatisfatórios, pois contrasta com as diferenças fisiológicas entre as espécies.

Além disso, autores relatam baixos índices de prenhez alcançados na espécie asinina utilizando-se sêmen congelado (Oliveira et al., 2006; Rota et al., 2008; Vidament et al., 2009). Contudo, estudos têm tentado melhorar esses parâmetros com adição do plasma seminal e/ou lavagem uterina pós-

inseminação (Rota et al., 2012), a fim de reduzir a resposta inflamatória pós-inseminação artificial (Sabatini et al., 2014).

O processo da criopreservação e descongelação causam sérias mudanças prejudiciais ao espermatozóide (Watson, 1981). Esses efeitos são causados pela crio-injúria e resultam na desestabilização das membranas espermáticas e comprometem a função dos espermatozoides (Muiño-Blanco et al., 2008). No entanto, Rota et al. (2012) divulgaram índice de 61,5% (8/13) de prenhez em jumentas utilizando sêmen congelado e diluído em plasma seminal.

O plasma seminal de mamíferos é uma secreção fisiológica da rede testis, epidídimos e glândulas acessórias do trato reprodutor masculino (Troedson et al., 2005), que desempenha um papel importante na maturação final de espermatozoides, através de eventos hormonais, enzimáticos e modificação de superfície, funcionando como um veículo para os espermatozoides (Mann, 1978). Os componentes orgânicos no plasma seminal são essenciais para manutenção do metabolismo, pH e osmolaridade espermática e as proteínas são a contribuição mais importante para a função desta célula em mamíferos (Maxwell et al., 2007).

O papel do plasma seminal na função do espermatozóide de mamíferos permanece em grande contradição no meio científico. Ambos os efeitos, inibitórios e estimulatórios, à função celular foram relatados (Muiño-Blanco et al., 2008). Contudo, Muiño-Blanco et al., (2008) afirmaram que a adição de proteínas do plasma seminal nos espermatozoides antes e/ou após a refrigeração do sêmen, é capaz de minimizar os efeitos da crio-injúria.

No entanto, a adição de 70% de plasma seminal autólogo em amostras

descongeladas de sêmen de jumento promoveu o decréscimo de todos os parâmetros de cinética espermática avaliados, e esses efeitos prejudiciais foram observados por 2 horas pós-descongelação (Sabatini et al., 2014).

Apesar de diversos autores relatarem os benefícios proporcionados pelo plasma seminal durante a cobertura, sua real função é discutível, uma vez que trabalhos utilizando espermatozóides da cauda do epidídimo acrescido ou não de plasma seminal não apresentaram diferenças nas taxas de concepção em equinos (Monteiro, 2013). Ainda, o mesmo autor relatou em seu experimento, que os espermatozóides do epidídimo após descongelação apresentaram superioridade nos parâmetros de cinética e viabilidade espermática, além de melhor fertilidade quando comprados com os do ejaculado (Monteiro, 2013).

Assim, pesquisas ligadas ao melhor entendimento que levam ao aprimoramento dos resultados com criopreservação devem ser incentivadas, no intuito de melhorar e investigar as peculiaridades reprodutivas nessa espécie.

Os objetivos deste estudo foram comparar a qualidade do sêmen de asinino “*in natura*” diluído e congelado: 1) Em dois diluentes comerciais, BotuSpecial® (BS) e INRA96® (IN) para avaliação “*in natura*”; 2) BotuCrio® (Botupharma, São Paulo – Botucatu/SP, Brasil) (BC) e INRA96® (INRA, IMV Technologies, France) modificado (Rota et al., 2012) (IC) para avaliação da congelação; 3) Analisar os efeitos da adição do plasma seminal autólogo após a descongelação sobre os parâmetros espermáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O trabalho foi realizado de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob protocolo nº 75/2015.

2.2 Animais

Foram utilizados 3 jumentos raça Pêga de fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 15 anos. Os jumentos foram mantidos com 3,0 kg ração/dia, feno, água e sal mineral *ad libitum*. Para estabilização da reserva extragonadal, foram realizadas anterior à fase experimental, 8 colheitas seriadas em dias consecutivos.

2.3 Colheita do sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas de cinco ejaculados de cada um dos três jumentos. O sêmen foi colhido com auxílio da vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, Brasil), após estimulação dos machos pela presença de jumentas em estro. Posteriormente, o sêmen foi filtrado para remoção da fração gel e somente aqueles ejaculados que alcançaram motilidade igual ou superior a 70%, foram utilizados para o processo. Uma alíquota foi retirada para determinação da concentração espermática por meio de contagem em câmara de Neubauer.

2.4 Obtenção e preparação do plasma seminal

As coletas destinadas à obtenção do plasma foram feitas da seguinte maneira: Logo após a colheita, o ejaculado colhido foi centrifugado a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4°C, para obtenção do plasma seminal. O “pelet” foi descartado e o sobrenadante passado em filtro de malha de 0,22 µm (Botupharma®, Botucatu, Brasil), e então aliquoteado em tubos criogênicos contendo 7 mL cada, que foram mantidos a -20°C, até as amostras serem utilizadas.

2.5 Diluentes para análise “*in natura*” e de congelação

Para avaliação do sêmen “*in natura*” utilizou-se os diluentes comerciais BotuSpecial® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) (BS) ou INRA96® (IMV Technologies, France) (IN), e na congelação os diluentes BotuCrio® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) (BC) ou INRA 96® modificado por Rota et al. (2012) (IC). Apenas o IC foi preparado no laboratório, utilizando-se INRA96®. Dos 200 mL que são comercializados, 16 mL foram retirados, sendo 8 mL desprezados e nos outros 8 mL foram adicionados 10 mL de gema de ovo. Esta solução de 18 mL foi agitada por 10 minutos, e centrifugada a 600 x g por 10 minutos (FANEN® Ltda, São Paulo, SP). Posteriormente, 16 mL do sobrenadante foram adicionados aos 184 mL de IN inicial (ROTA et al., 2012). A solução final foi dividida em duas alíquotas de 100 mL, e cada uma recebeu 4,4 mL de glicerol (Reagentes Sigma®). As soluções foram armazenadas a -20°C em alíquotas de 10 mL, até o momento do uso.

2.6 Processamento e avaliação das amostras do sêmen fresco

Após a fase de colheita, o sêmen foi fracionado em duas partes, de forma que uma foi diluída com Botu-sêmen Special[®] (BS) e a outra com INRA 96[®] (IN) a uma concentração de 50×10^6 spz/mL, para serem submetidas à análise de cinética espermática pelo método computadorizado CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) (VOS 12[®], Hamilton Thorne Research, Inc. Beverly, MA 01915 USA), utilizando a câmara *Mackler[®] Counting Chamber* (SEFi Medical Instruments Ltda, Irvine Scientific, USA) a 37°C e as configurações descritas no Quadro 1.

Os seguintes parâmetros de cinética espermática dos espermatozóides foram avaliados: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento de cabeça (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e espermatozóides VAP acima de 80 $\mu\text{m/s}$ (RAP, %).

159 Quadro 1. Ajuste do HTMA – IVOS – 10 para as realizações das análises
160 seminais em equídeos.

Parâmetros	Ajuste
Número de frames examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo das células	3 pixels
Contraste para células móveis	30
Limite inferior para o índice retilíneo	80%
Referência para velocidade média (VAP)	<70 µm/s
Referência para velocidade lenta (VCL)	<30 m/s
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 m/s
Limite inferior de tamanho	0,62 pixel
Limite superior de tamanho	2,98 pixel
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

161

162 A integridade da membrana plasmática dos espermatozóides (IMP, %)
163 foi avaliada em microscopia de epifluorescência (Leica® Microsystems –
164 Germany - DMLB, aumento de 400X), Foram contadas 200 células pela
165 associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto
166 de propídio, seguindo protocolo descrito por Harrison e Vickers (1990).

2.7 Criopreservação do sêmen

2.7.1 Grupo Botu-Crio[®]

Após a avaliação, o sêmen foi diluído em BS (1:1) e mantido a 24°C, durante 10 minutos e centrifugado a 600 x g por 10 minutos, na temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado com BotuCrio[®] (BC), na concentração de 200×10^6 espermatozoides móveis/mL, e envasados em palhetas de 0,5 mL.

Após o envase as palhetas foram estabilizadas em geladeira automática digital (Minitüb[®] – Porto Alegre-Brasil), por 20 minutos a 5°C. Em seguida, as palhetas foram criopreservadas em sistema automatizado para congelação de sêmen TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação Ltda., Uberaba, Brasil), a uma curva de -60°C/minuto (de 4°C a -140°C). Posteriormente, foram imersas em nitrogênio líquido e finalmente estocadas em botijão criogênico, denominando o grupo “BC”.

2.7.2 Grupo INRA[®]

Após a avaliação, o sêmen previamente diluído em IN, na proporção de 3:1 (diluente:sêmen) foi criopreservado segundo Rota et al. (2012), sendo mantido por 10 min a 24°C e posteriormente centrifugados a 600 x g por 10 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado com o mesmo diluente (IN) na concentração de 336×10^6 espermatozoides/mL. A amostra foi mantida a 4°C por 45 minutos, em seguida re-diluída com a solução contendo glicerol (IC) na proporção de 1:1 (IN:IC) e mantido por mais 15 minutos a 4°C. Após esse período, as palhetas de 0,5 mL foram preenchidas e congeladas em máquina automatizada TK[®] 4000C,

seguindo a mesma curva de congelação descrita para o grupo “BC”, antes de serem mergulhadas e estocadas no nitrogênio líquido a -196°C.

2.8 Descongelação do sêmen

Nos grupos BC e IC a descongelação foi realizada conforme Rota et al. (2012), em banho-maria, a 37°C por 30 segundos.

2.9 Avaliação espermática do sêmen descongelado

O sêmen descongelado foi avaliado quanto à cinética espermática pelo método CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), utilizando o equipamento (VOS 12[®], Hamilton Thorne Research, Inc. Beverly, MA 01915 USA), e a câmara *Mackler[®] Counting Chamber* (SEFi Medical Instruments Ltda, Irvine Scientific, USA).

Para as análises de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW; vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACS Diva[™] software v6.1, na qual foram também observados a integridade da membrana plasmática e acrossomal (MPAI), peroxidação lipídica (PERO) e concentração de espécies reativas de oxigênio total e íntegros (EROS T e EROS I).

2.9.1 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Para avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal foi utilizada a associação de iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma-Aldrich, St.

Louis, NO, EUA), Hoescht 33342 (H342; 14533, Sigma-Aldrich, St. Louis, NO, EUA) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada a isotiocianato de fluoresceína, L0770, Sigma-Aldrich, St. Louis, NO, EUA) de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2012). Assim, numa amostra de 200µL de sêmen diluído em TALP, segundo Parrish et al. (1988) modificado (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina), na concentração de 10x10⁶ espermatozóides/mL foram adicionados 5µL de H342 (100µg/mL em solução aquosa), 5µL de IP (50µg/mL em TALP) e 0,5µL de FITC-PSA (1mg/mL em DMSO), e então homogeneizados e incubados por 15 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Os espermatozóides foram classificados em 4 grupos, membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (MPLAI); membrana plasmática e acrossomal lesadas (MPAL); membrana plasmática e acrossomal íntegras (MPAI); e, membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (MPIAL). Para os resultados, foram considerados apenas a porcentagem de espermatozóides classificados como MPAI.

2.9.2 Avaliação da Peroxidação Lipídica

Este ensaio foi realizado de acordo com Guasti et al. (2012), utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Assim, uma amostra de 489,5 µL de sêmen diluído em TALP-PVA numa concentração de 5x10⁶ espermatozóides/mL foi adicionado 0,5 µL de C11BODIPY581/591 (1 mg/mL em DMSO), 5µL de IP (50 µg/mL), 5µL de H342 (100 µg/mL) e incubadas por 30 minutos a 37° C. Após a incubação,

foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300xg por 5 minutos com TALP-PVA e o “pellet” ressuspendido em 300µL de TALP-PVA.

2.9.3 Determinação de EROS intracelular

Para esta análise foi utilizada a sonda 5-(-6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceindiacetate (carboxi-H2DCFDA; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) de acordo com Guthrie e Welch (2006). Em 489,5µL de sêmen diluído em TALP-PVA na concentração de 5×10^6 /mL foi adicionado 0,5µL da sonda DCFDA (concentração final de 20µM, diluída em DMSO), 5µL de IP (50 µg/mL) e 5µL de H342 (100 µg/mL) e então incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Para todas as análises no citômetro de fluxo, as leituras foram realizadas em até 5 minutos após o preparo das amostras e os dados arquivados para posterior análise.

2.10 Adição do plasma seminal autólogo após a descongelação

O plasma seminal foi descongelado em banho-maria a 37°C. Após a descongelação e avaliação do sêmen, o conteúdo da palheta foi mensurado com pipeta automática e foram adicionados 70% de plasma seminal autólogo, no grupo “BC” e “IC”, formando os grupos “BC+PS” e “IC+PS,” respectivamente. O sêmen descongelado contendo o plasma seminal foi avaliado novamente para os mesmos parâmetros.

2.11 Análise estatística

Os resultados gerados foram analisados através do programa

computacional (SAS Institute Inc., 1985), sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de SHAPIRO-WILK (PROC UNIVARIATE) e a homogeneidade das variâncias comparadas pelo Teste QUI QUADRADO (Comando SPEC do PROC GLM). Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM), onde se avaliou o efeito do meio diluidor (BC e INRA) e sua interação com a presença de plasma seminal sobre a cinética, integridade estrutural e estresse oxidativo do sêmen asinino criopreservado. A comparação dos resultados médios obtidos por cada grupo experimental foi realizada através do teste de TUKEY. Foi adotado o nível de significância de 5% para todas as análises realizadas

3. RESULTADOS

Os parâmetros avaliados no sêmen “*in natura*” diluído estão descritos na tabela 1. O qual foi observado o efeito do meio diluidor, sobre os diversos parâmetros de cinética espermática para sêmen fresco. Pela análise de variância univariada foi observado diferença ($p \leq 0,05$) com superioridade para o diluente BS nos parâmetros MP, VAP, VSL, BCF, STR e LIN, e vantagem para o diluente IN nos parâmetros VCL e ALH.

Tabela 1. Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros integridade de membrana plasmática e cinética espermática para o sêmen fresco “*in natura*” diluído em Botu-sêmenSpecial® (BS) ou INRA 96® (IN).

GRUPO	BS	IN	Valor p
MT %	91,5 $\pm$ 2,9	91,2 $\pm$ 3,2	0,81
MP %	60,1 $\pm$ 6,7 ^a	54,3 $\pm$ 5,9 ^b	0,02
VAP μ m/s	136,3 $\pm$ 7,8 ^a	132,3 $\pm$ 10,3 ^b	0,05
VSL μ m/s	114,3 $\pm$ 8,4 ^a	106,1 $\pm$ 9,8 ^b	0,01
VCL μ m/s	212,1 $\pm$ 10,8 ^a	222,7 $\pm$ 15,4 ^b	0,03
ALH μ m	6,6 $\pm$ 0,4 ^a	7,4 $\pm$ 0,5 ^b	0,01
BCF Hz	33,4 $\pm$ 2,6 ^a	31,2 $\pm$ 2,5 ^b	0,05
STR %	82,4 $\pm$ 2,3 ^a	75,5 $\pm$ 13,0 ^b	0,04
LIN %	55,2 $\pm$ 3,8 ^a	48,4 $\pm$ 3,5 ^b	0,01
RAP %	85,8 $\pm$ 4,3	86,1 $\pm$ 6,1	0,96
IMP %	74,6 $\pm$ 12,7	73,2 $\pm$ 9,9	0,15

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvilinear; ALH: amplitude de batimento de cabeça; BCF: frequência de batimento de cabeça; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; RAP: espermatozóides com movimento rápido; IMP: Porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra.

Para o sêmen criopreservado comparando diferentes diluidores, BC e IC, acrescido também de plasma seminal, na qual os resultados dos referidos grupos para cinética espermática das doses descongeladas de BotuCrio® (BC); INRA® (IC); BotuCrio® + Plasma seminal (BC+PS) e INRA® + Plasma seminal (IC+PS), estão representados na tabela 2.

Foi verificada diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os dois diluidores, sem adição do plasma seminal, apenas para o parâmetro Linearidade (LIN) $47,8 \pm 2,3^a$ e $52,1 \pm 3,6^b$ (BC e IC) respectivamente.

Porém, a adição do plasma seminal em ambos os diluidores, diminui os parâmetros de MT, VCL, ALH, STR e RAP e melhorando somente LIN no grupo BC+PS, em relação ao BC ($p \leq 0,05$). Já para o grupo IC+PS, o acréscimo de plasma seminal foi deletério ($p \leq 0,05$) nos parâmetros MT, MP, ALH, STR e RAP e melhorando somente LIN, em comparação ao BC e ao IC.

Tabela 2. Médias $\pm$ desvios padrão dos parâmetros integridade de membrana plasmática e cinética espermática das doses descongeladas de BotuCrio[®] (BC); INRA[®] (IC); BotuCrio[®] + Plasma seminal (BC+PS) e INRA[®] + Plasma seminal (IC+PS).

GRUPO	BC	IC	BC+PS	IC+PS
MT %	78,0 $\pm$ 9,5 ^a	68,5 $\pm$ 18,45 ^{ab}	58,3 $\pm$ 12,8 ^{bc}	44,1 $\pm$ 20,2 ^c
MP %	45,5 $\pm$ 8,5 ^a	42,3 $\pm$ 13,6 ^a	36,3 $\pm$ 10,7 ^{ab}	28,7 $\pm$ 16,0 ^b
VAP μ m/s	101,8 $\pm$ 9,7	105,0 $\pm$ 17,1	92,7 $\pm$ 12,4	96,3 $\pm$ 13,3
VSL μ m/s	83,2 $\pm$ 8,7	89,3 $\pm$ 14,0	82,9 $\pm$ 9,5	83,5 $\pm$ 14,3
VCL μ m/s	177,6 $\pm$ 16,4 ^a	174,8 $\pm$ 28,3 ^a	147,8 $\pm$ 21,5 ^b	156,7 $\pm$ 18,3 ^{ab}
ALH μ m	6,4 $\pm$ 0,3 ^a	6,0 $\pm$ 0,6 ^{ab}	5,3 $\pm$ 0,7 ^c	5,8 $\pm$ 0,7 ^{bc}
BCF Hz	34,9 $\pm$ 3,2	36,5 $\pm$ 2,7	36,7 $\pm$ 3,1	35,3 $\pm$ 6,3
STR %	80,8 $\pm$ 2,1 ^a	83,6 $\pm$ 3,2 ^{ab}	86,6 $\pm$ 3,3 ^b	86,6 $\pm$ 4,2 ^b
LIN %	47,8 $\pm$ 2,3 ^a	52,1 $\pm$ 3,6 ^b	58,2 $\pm$ 4,3 ^c	56,0 $\pm$ 5,2 ^c
RAP %	64,6 $\pm$ 12,1 ^a	57,0 $\pm$ 20,6 ^{ab}	44,8 $\pm$ 14,5 ^{bc}	34,7 $\pm$ 19,1 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvilinear; ALH: amplitude de batimento de cabeça; BCF: frequência de batimento de cabeça; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; RAP: espermatozóides com movimento rápido.

Estão representados na tabela 3, os resultados da análise pela técnica de citometria de fluxo, quanto a integridade da membrana plasmática e acrossomal (MPAI), peroxidação lipídica (PERO) e concentração de espécies reativas de oxigênio total e íntegro (EROS T e EROS I) das doses descongeladas.

Tabela 3. Médias $\pm$ desvios padrão da integridade da membrana plasmática e acrossomal (MPAI), peroxidação lipídica (PERO) e concentração de espécies reativas de oxigênio total e íntegro (EROS T e EROS I) das doses descongeladas de BotuCrio[®] (BC); INRA[®] (IC); BotuCrio[®] + Plasma seminal (BC+PS) e INRA[®] + Plasma seminal (IC+PS), pela técnica de citometria de fluxo.

GRUPO	MPAI %	PERO %	EROS I %	EROS T %
BC	20,72 $\pm$ 7,45 ^a	27,62 $\pm$ 27,73 ^a	26,06 $\pm$ 22,47 ^a	12,32 $\pm$ 10,68 ^a
IC	14,03 $\pm$ 4,77 ^b	80,63 $\pm$ 25,51 ^b	67,46 $\pm$ 41,82 ^b	63,43 $\pm$ 40,45 ^b
BC+PS	20,67 $\pm$ 7,82 ^a	1,85 $\pm$ 1,45 ^c	84,6 $\pm$ 31,35 ^{b,c}	81,88 $\pm$ 32,52 ^{b,c}
IC+PS	23,31 $\pm$ 7,98 ^a	13,89 $\pm$ 18,90 ^{a,c}	93,61 $\pm$ 10,73 ^c	95,23 $\pm$ 7,51 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

MPAI: Integridade da Membrana Plasmática e Acrossomal; PERO: Peroxidação Lipídica; EROS I: Concentração de Espécies Reativas de Oxigênio Íntegro; e EROS T: Concentração de Espécies Reativas de Oxigênio Total.

A tabela 3 demonstra que o BC e o acréscimo do plasma seminal proporcionaram uma melhor integridade de membrana ($p \leq 0,05$). A peroxidação lipídica foi menor para o BC em comparação ao IC ($p \leq 0,05$), no entanto o acréscimo do plasma seminal às doses de BC, obtiveram menores valores significativos para esse parâmetro. As espécies reativas de oxigênio foram menores ($p < 0,05$) no grupo BC.

4. DISCUSSÃO

Arruda et al. (2011) afirmaram que nenhum teste isolado é capaz de prever a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias

características pode determinar uma maior fertilidade potencial. Ferreira et al. (1997) concluíram que não se poderia afirmar qual parâmetro gerado pelo CASA é capaz de prever a fertilidade ou taxa de fertilização do sêmen avaliado.

Porém, Matos et al. (2008) e Dorado et al. (2013) concluíram que algumas variáveis geradas pela análise computadorizada, assim como a linearidade parecem apresentar maior correlação com fertilidade. No presente estudo, o BS apresentou maior linearidade para sêmen fresco ($55,2 \pm 3,8^a$ vs $48,4 \pm 3,5^b$) em comparação com IN, e os grupos que receberam plasma seminal na descongelação BC+PS ($58,2 \pm 4,3^c$) e IC+PS ($56,0 \pm 5,2^c$), respectivamente obtiveram resultado estatisticamente superior para esse parâmetro.

Entretanto, Love (2011) concluiu que a porcentagem de motilidade total e a velocidade progressiva foram os dois únicos parâmetros de cinética espermática, juntamente com a porcentagem de cauda dobrada, os únicos parâmetros morfológicos, capazes de distinguir altas e baixas taxas de prenhez. Seguindo essa afirmação, no presente estudo não haveria diferença de prenhez entre os diluidores de sêmen fresco BS e IN. Contudo, segundo o mesmo autor, os grupos de diluidores de congelação BC e IC tenderiam ter maiores taxas de prenhez, pois apresentaram motilidade total ($78,0 \pm 9,5^a$ vs $68,5 \pm 18,45^{ab}$) estatisticamente maiores do que as amostras que receberam o plasma seminal.

Dorado et al. (2013) observaram que valores de amplitude lateral de cabeça (ALH) foram significativamente altos, e velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL) e velocidade de trajeto (VAP) foram baixos nos

ejaculados de jumentos que eram classificados como sub-férteis, com baixas taxas de fertilidade (taxas de prenhez < 40%). Progredindo nessas comprovações, o atual estudo constatou que somente no grupo de diluidor de sêmen "*in natura*" IN ocorreu essa associação de alto valor de ALH e baixos valores de VCL, VSL e VAP. Podendo, segundo esses autores, considerar o diluidor IN com possibilidade de apresentar menor taxa de prenhez quando comparado com BS. E ainda o mesmo referido trabalho, Dorado et al. (2013), ainda encontraram altos valores nos parâmetros VCL, VAP e frequência de batimento de cabeça (BCF) em jumentos considerados férteis (taxas de prenhez $\geq 60\%$), nas quais em nosso presente estudo constatou que o diluidor de sêmen fresco BS e criopreservado BC e IC apresentaram esta associação de valores dos respectivos parâmetros citados, podendo ter maiores chances de prenhez, segundo os dados dos autores mencionados.

Dorado et al. (2013) ainda correlacionaram parâmetros de análises espermáticas com fertilidade de jumento, sendo esses parâmetros e suas respectivas correlações com a fertilidade: MT ($r = 0,37$), MP ($r = 0,53$), VCL ($r = 0,44$), LIN ($r = 0,39$), BCF ($r = 0,44$). Seguindo essa análise, o presente estudo constatou que os diluidores de criopreservação BC e IC apresentaram estatisticamente melhores parâmetros para MT, MP e VCL, já os grupos que foram rediluídos com plasma seminal após a descongelação (BC+PS e IC+PS) obtiveram desempenho estatístico superior para o parâmetro linearidade (LIN).

Sabatini et al. (2014) relataram no estudo sobre adição de 70% ou 20% de plasma seminal em amostras descongeladas de sêmen de jumento, que este processamento promoveu o decréscimo de todos os parâmetros de cinética espermática avaliados, e esse efeito prejudicial foi observado até 2

horas pós-descongelação, causando efeitos deletérios na membrana plasmática, corroborando com os resultados do presente estudo, já que adição de 70% de plasma seminal autólogo no sêmen descongelado promoveu piora da MT, VCL, ALH e RAP para o grupo BC+PS, e MT, MP, ALH e RAP para o grupo IC+PS. Porém, Andrade et al., (2011) constatou que acréscimo de 20% de plasma autólogo de garanhões com boa qualidade espermática, não alterou a MT.

No entanto, Maxwell et al. (2007) observaram melhoras nos parâmetros de motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e respiração mitocondrial, quando adicionado plasma seminal de carneiro em amostras de sêmen descongelados, fato não observado em nosso estudo com asinino, na qual observamos apenas melhoras nos parâmetros STR e LIN para ambos os grupos que receberam adição do plasma seminal.

O estresse oxidativo é uma condição associada com aumento da produção de radicais livres de oxigênio, comumente conhecido Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e acredita-se que elas estão na base da etiologia de inúmeras disfunções celulares, sendo os espermatozóides de mamíferos capazes de gerar naturalmente EROS e afetar negativamente a função espermática (Agarwal & Saleh., 2002). Andrade et al. (2012) constataram um aumento da peroxidação lipídica em sêmen descongelado de garanhões, no entanto observamos que, adição de 70% de plasma seminal de asinino nas doses descongeladas diminui a peroxidação. Segundo Nakamura et al. (2002) os peróxidos lipídicos são originados a partir das reações de EROS com os ácidos graxos insaturados da membrana plasmática (fosfolipídios) e com o DNA do espermatozóide. No entanto, Andrade et al., (2011) verificou que

419 acréscimo de 20% de plasma seminal autólogo aumentou a população de
420 células com boa integridade de membrana plasmática e acrossomal, esses
421 dados corroboram com nossos dados com plasma de asinino, na avaliação
422 pela citometria de fluxo.

423 Fernández-Gago et al. (2013) citam a criocapacitação como mudanças
424 que ocorrem durante a refrigeração e congelação espermática, modificando
425 componentes da membrana plasmática além de causar reação acrossomal
426 precoce, prejudicando a capacidade da célula de interação com o oviduto e
427 fertilização. Durante esse processo, os radicais livres atuam como segundos
428 mensageiros, que ativam a capacitação do espermatozóide. Em seu estudo
429 com suínos, observaram que amostras de sêmen constituídas de 50% de
430 plasma seminal aumentaram a fluidez e dano na membrana, havendo maior
431 produção intracelular de EROS, dano ao acrossoma e presença de radicais
432 livres na superfície celular, sendo que em nossos dados foi constatado
433 somente um aumento EROS, porém a integridade de membrana acrossomal
434 não foi alterada.

435 Andrade et al. (2012) descreveram que embora o plasma seminal
436 contenha mecanismos antioxidantes que impedem os efeitos nocivos do
437 EROS, isto não faz reduzir a peroxidação das membranas espermáticas, uma
438 vez que EROS, provavelmente estão relacionados com o processo de
439 criopreservação, sendo que Wang et al., (1997) relataram aumento significativo
440 de EROS durante este processo.

441 Decorrente do aumento na concentração de EROS há registro de queda
442 da motilidade dos espermatozóides, devido à peroxidação de ácidos graxos
443 poliinsaturados da membrana, gerando queda na disponibilidade de ATP e

alteração dos sítios de ligação da membrana mitocondrial, segundo Hammadeh et al. (2006), nesse presente trabalho foi observado que a adição de plasma seminal nas amostras de ambos os diluentes, não determinou melhora nos parâmetros de motilidade, mas diversalmente, houve diminuição ($p < 0,05$) na MT, VCL, ALH, STR e RAP, possivelmente devido ao aumento na concentração de EROS como descrito e observado no estudo de Hammadeh et al. (2006).

O plasma seminal é constituído de pequenas partículas que aparentemente compreendem funções antioxidantes e imunomoduladoras (Burden et al., 2006), impedindo os efeitos nocivos de EROS (Marques et al., 2002). Esse efeito antioxidante não foi observado no presente estudo com jumentos, apesar da peroxidação lipídica ter sido significativamente menor no grupo que recebeu adição de plasma seminal, a quantidade de EROS foi maior. Contudo, Andrade et al. (2012) não constatou o efeito de proteção do plasma seminal no ensaio com equinos, pois a peroxidação foi maior no período de incubação.

Fernández-Gago et al. (2013) averiguaram mudanças na fisiologia espermática de javali quando adicionado 50% de plasma seminal, em que foi verificado um aumento de EROS intracelular acompanhado pelo aumento dos danos na membrana plasmática, igualmente observado nos dados de EROS apresentados no presente experimento com asinino, porém a integridade de membrana não teve alteração significativa ($p > 0,05$) no grupo que recebeu acréscimo de 70% de plasma seminal.

Com isso, observamos que os avanços nos testes laboratoriais aplicados a avaliação espermática têm obtido grande êxito para excluir

amostras de sêmen de animais com baixo potencial fecundante, no entanto, fica como grande desafio apontar, dentre os animais férteis, quais os mais aptos a proporcionar as maiores taxas de prenhez (Arruda et al., 2011). Contudo, baseando-se nos atuais resultados comparando com estudos de cinética espermática já relatada nas espécies asininas e equinas, vimos que diferentes diluidores, tanto de sêmen fresco "*in natura*" quanto criopreservado, associado ou não a adição do plasma seminal, podem aumentar ou diminuir o potencial de fertilização dos jumentos.

Concluindo a superioridade dos parâmetros de cinética espermática do diluente BS utilizado no sêmen "*in natura*" e a similaridade entre os diluentes de criopreservação BC e IC para os mesmos parâmetros de cinética, contudo a citometria de fluxo mostrou uma melhor MPAl para o BC. O acréscimo de 70% de plasma seminal autólogo mostrou-se deletério na cinética espermática, porém obteve parâmetros satisfatórios na MPAl e PERO, mas degradante para EROS. Contudo, mais pesquisas relacionadas ao plasma seminal de asinino devem ser desenvolvidas para melhor elucidar os efeitos sobre as células espermáticas dessa espécie.

5. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A., SALEH, R.A., 2002. Role of oxidants in male in fertility: rationale, significance and treatment. *Urol Clin North Am*, 29, 817–827.
- ANDRADE, A.F.C.; ZAFFALON, F.G.; CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; BRESSAN, F.F.; MARTINS, S.M.M.K.; ARRUDA, R.P., 2012. Post-thawed addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *SciVerse Science Direct, Theriogenology* 77, 1866-1872.
- ANDRADE, A.F.C., ZAFFALON, F.G., CELEGUINI, E.C.C., NASCIMENTO, J., TARRAGÓ, O.F.B., MASTINS, S.M.M.K., ALONSO, M.A., ARRUDA, R.P., 2011. Addition of seminal plasma to post-thawing equine semen: What is the effect on sperm cell viability?, *Reprod Dom Anim* 46, 682-686.
- ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., ANDRADE, A.F.C., RAPHAEL, C.F., PERES, K.R., NEVES, L.C., 2006. Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF. IN: Simpósio internacional de reprodução animal aplicada, 2, 2006, Londrina, pr. Londrina: [s.n.], 157-164.

- 507 ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.;
508 OLIVEIRA L.Z; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES,
509 K.M.; JAIMES, J.D., 2011. Métodos de avaliação da morfologia e função
510 espermática: momento atual e desafios futuros. Rev. Bras. Reprod. Anim.,
511 Belo Horizonte, v.35,n.2,145-151.
- 512
- 513 AVANZI, B.R., RAMOS, R.S., ARAUJO, G.H.M., FIORATTI, E.G., TRINCA,
514 L.A., DELL'AQUA JR, J.A., OÑA, C.M.M., ZAHN, F.S., MARTIN, I.,
515 ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., 2015. Fixed-time insemination with frozen
516 semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? Theriogenology, 83,
517 1389-1393.
- 518
- 519 BEDFORD-GUAUS, S.J., 2007. Transported stallion semen and breeding
520 mares with cooled or frozen-thawed semen. Clinical Techniques in Equine
521 Practice 6, 239-248.
- 522
- 523 BURDEN, H.P., HOLMES, C.H., PERSAD, R., WHITTINGTON, K., 2006.
524 Prostatomes– their effects on human male reproduction and fertility. Hum
525 Reprod Update,12, 283–292.
- 526
- 527 DORADO, J., ACHA, D., ORTIZ, I., GÁLVEZ M.J., CARRASCO, J.J., DÍAZ, B.,
528 GÓMEZ-ARRONES, V., CALERO-CARRETERO, R., HIDALGO, M., 2013.
529 Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility
530 patterns and fertility of Andalusian donkeys (*Equus asinus*). Animal
531 Reproduction Science, 143, 64-71.

- 532 FERNÁNDEZ-GAGO, R., DOMÍNGUEZ, J.C., MARTÍNEZ-PASTOR, F., 2013.
533 Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow
534 cytometry study. *Theriogenology*, 80, 400–410.
535
- 536 FERREIRA, J.C.P., NEVES NETO, J.R., PAPA F.O., 1997. Avaliação
537 computadorizada das características espermáticas de garanhões com
538 fertilidade comprovada. *Rev Bras Reprod Anim*, 21, 131-132.
539
- 540 FREITAS-DELL'AQUA, C.P., GUASTI, P.N., MONTEIRO, G.A., MAZIERO,
541 R.R.D., DELL'AQUA JR, J.A., PAPA, F.O., 2012. Flow cytometric analysis
542 of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim Reprod*, 9, 941.
543
- 544 GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWIG,
545 F.P.; MONTEIRO, G.A.; LISBOA, F.P.; PAPA, F.O., 2012. Validation of flow
546 cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine
547 spermatozoa. IV International Symposium on Animal Biology of
548 Reproduction, Animal Reproduction. October 17-20.
549
- 550 GUTHRIE, H. D., WELCH, G. R., 2006. Determination of intracellular reactive
551 oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-
552 treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J.*
553 *Anim. Sci.*, 84, 2089–2100.

HAMMADEH, M.E., RADWAN, M., AL-HASANI, S., MICU, R., ROSENBAUM, p., LORENZ, M., SCHMIDT, W., 2006. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and nonpregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod BioMed Online*, v.13, n.5, 696–706.

HARRISON, R.A., VICKERS, S.E., 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 343-352.

LOOMIS, P.R., SQUIRES, E.L., 2005. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology*, 64, 480-491

LOVE, C.C., 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. *Theriogenology*, 76, 547-557.

MANN T, 1978. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. *Int J Fertil*, 23, 133–137.

MARQUES, A., ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., GOBESSO, A.A.O., NEVES NETO, J.R., 2002. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology*, 58, 257– 260.

- 578 MATOS, D.L., ARAÚJO, A.A., ROBERTO, I.G., TONIOLLI, R., 2008. Análise
579 computarizada de espermatozóides: revisão de literatura. Rev Bras
580 ReprodAnim, 32, 225-232.
- 581
- 582 MAXWELL, W.M.C., DE GRAAF, S.P., GHAOUI. RE-H., EVANS. G., 2007.
583 Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. Soc Reprod
584 Fertil Suppl, 64, 13–38
- 585
- 586 MONTEIRO, G.A., 2013. Criopreservação e fertilidade de espermatozóides do
587 ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões subférteis.
588 2013. 263 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de
589 Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de
590 Botucatu.
- 591
- 592 MUIÑO-BLANCO, T., PÉREZ-PÉ, R., CEBRIÁN-PÉREZ J.A., 2008. Review
593 Article: Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reprod
594 Dom Anim, 43 (suppl. 4), 18-31.
- 595
- 596 NAKAMURA, H., KIMURA, T., NAKAJIMA, A., SHIMOYA, K., TAKEMURA, M.,
597 HASHIMOTO, K., ISAKA, S., AZUMA, C., KOYAMA, M., MURATA, Y.,
598 2002. Detection of oxidative stress in seminal plasma and fractionated
599 sperm from subfertile male patients. Europ J of Obst & Gynec and Reprod
600 Bio, 105, 155–160.
- 601

- OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M; MACEDO, L.M.;
DELL'AQUA Jr, J.A.; PAPA, F.O., 2006. Effect of cryoprotectant on donkey
sêmen freezability and fertility. *Animal Reproduction Science* 94, p. 82-84.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., WINER, M.A., FIRST, N.L., 1988.
Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38,
1171-1180.
- ROTA, A., MAGELLI, C., PANZANI, D., CAMILLO, F., 2008. Effect of extender,
centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata
donkey spermatozoa. *Theriogenology* 69. 176-185.
- ROTA, A., PANZANI, D., SABATINI C., CAMILO, F., 2012. Donkey jack (*Equus
asinus*) sêmen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post
breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies.
Theriogenology, 78,1846–1854.
- SABATINI, C., MARI, G., MISLEI, B., LOVE C.C., PANZANI, D., CAMILLO, F.,
ROTA. A., 2014. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility,
viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus
asinus*) spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, 49, 989-994.

- 624 TROEDSSON, M.H., DESVOUSGES, A., ALGHAMDI, A.S., DAHMS, B., DOW,
625 C.A., HAYNA, J., VALESCO, R., COLLAHAN, P.T., MACPHERSON, M.L.,
626 POZOR, M., BUHI, W.C., 2005. Compnents in seminal plasma regulating
627 sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89, 171-
628 186.
- 629
- 630 VIDAMENT, M., VINCENT, P., MARTIN, F.X., MAGISTRINI, M., BLESBOIS, E.,
631 2009. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled
632 and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci*, 112, 22–35.
- 633
- 634 WANG, A.W., ZHANG, H., IKEWOTO, I., ANDERSON, D.J., LOUGHLIN, KR.
635 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during
636 cryopreservation. *Adult Urology*, 49, 921-925
- 637
- 638 WATSON P.F., 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In:
639 Clarke A (ed.), *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*.
640 Academic Press, London, 189–218.
- 641
- 642 WILDT, D.E., PUKAZHENTI, B., BROWN, J., MONFORT, S., HOWARD, J.G.,
643 ROTH., 1995. Spermatology for understanding, managing and conserving
644 rare species. *Reprod Fertil Dev* 7, 811–24.

CAPÍTULO 3

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES DILUIDORES DE CONGELAÇÃO,
DO PLASMA SEMINAL E DA LAVAGEM UTERINA SOBRE A
FERTILIDADE DE JUMENTAS (*Equus asinus*)**

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2, pelo QUALIS – CAPES de 2015.

RESUMO

A inseminação artificial é uma importante biotecnologia para o melhoramento genético das espécies domésticas. Apesar dessa técnica apresentar índices satisfatórios de fertilidade para a espécie equina (*Equus caballus*), esses resultados ainda não foram reproduzidos para a espécie asinina (*Equus asinus*). Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar se a adição do plasma seminal autólogo ao sêmen criopreservado de jumentos e se sua associação à lavagem uterina pós-inseminação, interfere nos índices de fertilidade das jumentas, além de observar a taxa de prenhez de dois diluentes de congelamento de sêmen. Para isso, foram utilizados 86 ciclos de 33 jumentas divididas em 8 grupos descritos a seguir: G1) BotuCrio + Plasma Seminal + Lavagem uterina (BC + PS + L) e G2) INRA + Plasma Seminal + Lavagem uterina (IC + PS + L) foram testados mediante inseminações em 14 ciclos cada, e os grupos G3) Botucrio + Lavagem uterina (BC + L) e G4) INRA + Lavagem uterina (IC + L) foram testadas em 11 ciclos cada, sendo a lavagem uterina realizada 10 horas após a IA; nos grupos G5) BotuCrio + Plasma Seminal (BC + PS) e G6) INRA + Plasma Seminal (IC + PS) foram inseminadas em 8 ciclos

cada, e os grupos G7) BotuCrio (BC) e G8) INRA (IC), foram avaliadas em 10 ciclos cada. Foi observado que a adição de plasma seminal no momento da inseminação, associado à lavagem uterina 10h após, obteve numericamente melhores índices de prenhez. No entanto, foi concluído que a adição do plasma seminal, independente do tratamento, não influenciou nas taxas de fertilização ($p = 0,6582$), contudo o efeito de lavar ou não o útero após a inseminação, independente do tratamento, tem influência positiva na taxa de prenhez ($p = 0,0097$), demonstrando que esse procedimento de lavagem uterina, 10h após a inseminação, aumentou em 8,7 vezes a chance de prenhez em jumentas.

Palavras-chave: criopreservação, fertilidade, jumento, lavagem uterina, plasma seminal, sêmen congelado.

1. INTRODUÇÃO

A aplicação do processo de criopreservação espermática na espécie asinina apresenta índice de fertilidade reduzida comparado, com sêmen fresco [1]. Além disso, autores relatam baixos índices de prenhez alcançados na espécie asinina utilizando-se sêmen congelado [2,3,4]. Contudo, estudos têm tentado melhorar esses parâmetros com adição do plasma seminal e/ou lavagem uterina pós-inseminação [5] a fim de reduzir a resposta inflamatória pós-inseminação artificial [6].

A obtenção de conceito por meio da inseminação artificial com sêmen congelado em jumentas é muito mais difícil do que em éguas [7]. Nesta espécie, as boas taxas de prenhez são geralmente obtidas quando utilizados sêmen fresco ou refrigerado [2], mas podem ser muito insatisfatórias com o

49 emprego de sêmen criopreservado [3,4,8].

50 Contudo, estudos têm tentado melhorar esses índices com adição do
51 plasma seminal e/ou lavagem uterina pós-inseminação, como os de Rota et al.
52 [5], que obtiveram índice de 61,5% (8/13) de prenhez em jumentas utilizando
53 essa técnica. Sabatini et al. [6] ainda relata que a utilização do plasma seminal
54 na inseminação reduz a resposta inflamatória duradoura pós-inseminação
55 artificial.

56 O plasma seminal de mamíferos é uma secreção fisiológica da rede
57 testis, epidídimos e glândulas acessórias do trato reprodutor masculino [9], que
58 desempenha um papel importante na maturação final de espermatozóides,
59 através de eventos hormonais, enzimáticos e modificação de superfície,
60 funcionando como um veículo para os espermatozóides [10]. Os componentes
61 orgânicos no plasma seminal são essenciais para manutenção do
62 metabolismo, pH e osmolaridade espermática e as proteínas são a contribuição
63 mais importante para a função desta célula em mamíferos [11].

64 O papel do plasma seminal na função do espermatozóide de mamíferos
65 permanece em grande contradição no meio científico. Ambos os efeitos,
66 inibitórios e estimulatórios à função celular foram relatados [12]. Contudo,
67 Muiño-Blanco et al. [12], afirmaram que a adição de proteínas do plasma
68 seminal nos espermatozóides antes e/ou após a refrigeração do sêmen, é
69 capaz de minimizar os efeitos da crioinjúria.

70 No entanto, a adição de 70% de plasma seminal em amostras
71 descongeladas de sêmen de jumento promoveu o decréscimo de todos os
72 parâmetros de cinética espermática avaliados, e esse efeito prejudicial
73 permaneceu após 2 horas pós-descongelação [6].

A centrifugação com posterior remoção do plasma seminal teve um efeito positivo na motilidade e integridade na membrana plasmática de espermatozóides de jumentos refrigerados [13]. Já Robertson [14], afirmou que o plasma seminal não é necessário para a fertilização, porém é um meio que facilita as interações entre o útero e os gametas masculinos, maximizando assim a probabilidade de concepção.

Apesar de diversos autores relatarem os benefícios proporcionados pelo plasma seminal durante a cobertura, sua real função é discutível, uma vez que trabalhos utilizando espermatozóides da cauda do epidídimo acrescido ou não de plasma seminal não apresentaram diferenças nas taxas de concepção em equinos [15]. Ainda o mesmo autor relatou em seu experimento, que os espermatozóides do epidídimo após descongelação apresentaram superioridade nos parâmetros de cinética e viabilidade espermática, além de melhor fertilidade [15].

A resposta inflamatória uterina é desencadeada pelos espermatozóides e outros componentes do sêmen, iniciando-se normalmente dentro de 1 h da inseminação, atingindo picos em 6-12 horas e, finalmente, diminuindo após 24-36h em éguas [9]. Sendo que Vilés et al. [7] afirmaram que a resposta inflamatória uterina é hipotetizada como uma das principais causas da menor taxa de prenhez em jumentas utilizando-se sêmen congelado.

Com intuito de observar os efeitos da adição do plasma seminal ao sêmen asinino descongelado sobre a reação inflamatória uterina de jumentas, Rota et al. [5] realizaram dois lavados uterinos por ciclo (6 e 10h após as inseminações) com 1L de Ringer com Lactato em cada lavado e constataram que o grupo inseminado com re-diluição do plasma seminal obteve uma

concentração maior de PMN's em seus lavados recuperados, quando comparados com o grupo que não recebeu re-diluição alguma após a descongelação.

Porém, Miró et al. [17] constataram que a presença do plasma seminal em amostras de sêmen fresco de jumentos foi responsável pela redução da resposta inflamatória, devido a observações *in vitro* de supressão da ligação do espermatozóides com PMN's. Segundo Rota et al., [5] a lavagem uterina em jumentas após as inseminações com sêmen congelado pode ter influência nas taxas de prenhez, de forma que novas pesquisas são necessárias para confirmar essa hipótese [5]. Uma vez que esses autores obtiveram índices satisfatórios de prenhez, no grupo inseminado re-diluído com plasma seminal e realizado lavagem uterina pós-inseminação. Sendo uma crítica dos próprios autores ao seu estudo, uma vez que todos os grupos receberam lavagem uterina pós-inseminação, não sendo possível avaliar a influência desse procedimento sobre os índices de fertilidade.

Objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do lavado uterino 10h após inseminação, associada ou não à adição de plasma seminal ao sêmen congelado de jumento influencia nos índices de fertilidade de jumentas. Além de observar a taxa de prenhez de dois diluentes de congelação de sêmen.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos

O trabalho foi realizado de acordo com os preceitos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob protocolo nº 75/2015.

2.2 Animais

Foram utilizados 2 jumentos machos da raça Pêga de fertilidade comprovada, com idades entre 5 e 15 anos. Os jumentos foram mantidos com 3,0 kg ração/dia, feno, água e sal mineral *ad libitum*. Para estabilização da reserva extra-gonadal, foram realizadas anterior à fase experimental, 8 colheitas seriadas em dias consecutivos.

Foram utilizados 86 ciclos de 33 jumentas fêmeas das raças Pêga e Nacional, sem histórico de infertilidade e com citologia uterina negativa ($\leq 1\%$ de Polimorfonucleares por contagem de 100 células), conforme descrito por Ley et al., [18]. O experimento foi desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ – UNESP - Botucatu/SP (FMVZ).

2.3 Colheita do sêmen

As amostras de sêmen foram obtidas de cinco ejaculados de cada dois jumentos, totalizando 10 ejaculados. O sêmen foi colhido com auxílio da vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, Brasil). A estimulação dos machos foi realizada pela presença de jumentas em estro. Posteriormente, o sêmen foi filtrado para remoção da fração gel e somente aqueles ejaculados que alcançaram motilidade igual ou superior a 70%, foram utilizados para o processo. Uma alíquota foi retirada para determinação da concentração espermática por meio de contagem em câmara de Neubauer.

2.4 Obtenção e preparação do plasma seminal

As coletas destinadas à obtenção do plasma foram feitas da seguinte maneira: Logo após a colheita, dos mesmos 2 jumentos, o ejaculado colhido foi centrifugado a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4°C, para obtenção do plasma seminal. O “pelet” foi descartado e o sobrenadante passado em filtro de malha de 0,22 µm (Botupharma®, Botucatu, Brasil), e então aliquoteado em tubos criogênicos contendo 7 mL cada, que foram mantidos a -20°C, até as amostras serem utilizadas.

2.5 Diluentes de congelação

Para congelação foram utilizados os diluentes BotuCrio® (Botupharma®, Botucatu, Brasil) (BC) ou INRA 96® (IMV Technologies, France) modificado por Rota et al. [5] (IC). Apenas o IC foi preparado no laboratório, utilizando-se INRA96®. Dos 200 mL que são comercializados, 16 mL foram retirados, sendo 8 mL desprezados e nos outros 8 mL foram adicionados 10 mL de gema de ovo. Esta solução de 18 mL foi agitada por 10 minutos, e centrifugada a 600 x g por 10 minutos (FANEN® Ltda, São Paulo, SP). Posteriormente, 16 mL do sobrenadante foram adicionados aos 184 mL de IN inicial (ROTA et al., 2012). A solução final foi dividida em duas alíquotas de 100 mL, e cada uma recebeu 4,4 mL de glicerol (Reagentes Sigma®). As soluções foram armazenadas a -20°C em alíquotas de 10 mL, até o momento do uso.

2.6 Criopreservação do sêmen

2.6.1 Grupo Botu-Crio®

Após a avaliação, o sêmen diluído em BS (1:1) foi mantido a 24°C,

durante 10 minutos e centrifugado a 600 x g por 10 minutos, na temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado com BotuCrio[®], na concentração de 180×10^6 espermatozoides móveis/mL, e envasados em palhetas de 0,5 mL.

Após o envase as palhetas foram estabilizadas em geladeira automática digital (Minitüb[®] – Porto Alegre - Brasil), por 20 minutos a 5°C. Em seguida, as palhetas foram criopreservadas em sistema automatizado para congelamento de sêmen TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), a uma curva de -60°C/minuto (de 4°C a -140°C). Posteriormente, foram imersas em nitrogênio líquido e finalmente estocadas em botijão criogênico (inteirando o grupo “BC”).

2.6.2 Grupo INRA[®]

Após a avaliação, o sêmen previamente diluído em INRA 96[®], na proporção de 3:1 (diluyente:sêmen) foi criopreservado segundo Rota et al. [5], sendo mantido por 10 min a 24°C e posteriormente centrifugado a 600 x g por 10 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspensionado com o mesmo diluyente na concentração de 336×10^6 espermatozoides/mL. A amostra foi mantida a 4°C por 45 minutos, em seguida re-diluída com a solução contendo glicerol (IC) na proporção de 1:1 (INRA 96[®]: IC) e mantido por mais 15 minutos a 4°C. Após esse período, as palhetas de 0,5 mL foram preenchidas e congeladas na máquina automatizada TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelamento Ltda., Uberaba, Brasil), seguindo a mesma curva congelamento descrita para o grupo “BC”, sendo na sequência mergulhadas e estocadas no nitrogênio líquido a -196°C.

2.7 Acompanhamento folicular e indução da ovulação

Os ciclos reprodutivos das jumentas foram acompanhados diariamente por avaliação ultrassonográfica (Mindray® DP-2200Vet) do status ovariano e uterino. Quando o maior folículo atingiu ≥ 31 mm de diâmetro e a jumenta apresentou sinais de cio (micção frequente, movimentos mastigatórios e imobilização na presença do macho), a ovulação foi induzida com 1000 µg do análogo do GnRH, deslorelina, I.M. (Hormônio Liberador de Gonadotrofina, Botupharma®, Botucatu, Brasil).

2.8 Descongelação do sêmen

Os grupos BC e IC a descongelação foi realizada conforme Rota et al. [5], em banho-maria, a 37°C, por 30 segundos.

2.9 Adição do plasma seminal ao sêmen descongelado e Inseminação Artificial

No momento da inseminação, o plasma seminal autólogo foi descongelado em banho-Maria a 37°C.

A dose inseminante foi de 6 palhetas para ambos os diluidores BotuCrio® (BC) ou INRA, totalizando aproximadamente 500×10^6 espermatozóides em alíquota de 3 ml, e acrescida de 7 ml de plasma seminal autólogo descongelado para os grupos que destinavam esse procedimento, totalizando um volume inseminante de 10 ml, que após homogeneizado foi depositado no corpo uterino com auxílio de uma pipeta de inseminação, 37h após a indução com deslorelina. Os ciclos estrais que não ovularam até 48h da indução com deslorelina, foram retirados das análises estatísticas.

2.9 Lavagem uterina

A lavagem uterina (L), nos animais destinados a este procedimento, seguiu os critérios de Rota et al. [5]. A lavagem uterina foi realizada com o volume 1000 mL de Ringer com Lactato infundido no útero das jumentas e drenado em seguida, com auxílio de cateter nº 28[®] (Bivona[®], Kruuse, Denmark) para “flushing” de embrião equino. Formando assim os grupos BC+PS+L; INRA+PS+L; BC+L e INRA+L;

2.10 Diagnóstico de prenhez

O diagnóstico de prenhez foi realizado aos 14 dias pós-ovulação, com auxílio do ultrassom com transdutor linear Mindray[®] (Mindray, DP-2200Vet), e reconfirmado 3 dias após. Foi considerado positivo quando visualizada vesícula embrionária.

2.11 Análise estatística

Os resultados de concepção foram analisados pelo programa Proc GLM in SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Como os resultados de concepção das jumentas inseminadas implicam em resposta binária (prenhe ou vazia) foi realizada a análise de regressão linear múltipla, sendo incluídos no modelo o efeito do meio diluente, dos tratamentos (lavagem uterina *versus* plasma seminal), admitindo-se o nível de significância de 5%.

Uma segunda análise de regressão logística simples foi conduzida incluindo no modelo estatístico apenas a variável lavagem uterina *versus* sem lavagem uterina, sendo que as principais variáveis foram eliminados no modelo de regressão final (com base no critério de Wald de $P > 0,20$), de modo que a

lavagem uterina era o único efeito considerado. E outra análise de regressão logística simples, incluindo adição de plasma seminal *versus* não adição do plasma seminal, sobre o índice de prenhez também foi feita, novamente sendo que as principais variáveis foram eliminadas no modelo de regressão final (com base no critério de Wald de $P > 0,20$), de modo que a adição do plasma seminal era o único efeito considerado. A razão de possibilidades (*odds ratio*) foi calculada para variável lavagem uterina *versus* taxa de prenhez. Novamente foi considerado o nível de significância de 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS

Os resultados dos índices de prenhez dos 8 diferentes grupos testados estão representados na tabela 1, sendo os respectivos grupos G1) BotuCrio® + Plasma seminal + Lavagem uterina (BC+PS+L); G2) INRA + Plasma seminal + Lavagem uterina (INRA+PS+L); G3) BotuCrio® + Lavagem uterina (BC+L); G4) INRA + Lavagem uterina (INRA+L); G5) BotuCrio® + Plasma seminal (BC+PS); G6) INRA + Plasma seminal (INRA+PS); G7) BotuCrio® (BC) e G8) INRA.

Tabela 1. Taxa de prenhez dos grupos G1) BotuCrio® + Plasma seminal + Lavagem uterina (BC+PS+L); G2) INRA + Plasma seminal + Lavagem uterina (INRA+PS+L); G3) BotuCrio® + Lavagem uterina (BC+L); G4) INRA + Lavagem uterina (INRA+L); G5) BotuCrio® + Plasma seminal (BC+PS); G6) INRA + Plasma seminal (INRA+PS); G7) BotuCrio® (BC) e G8) INRA.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
Prenhez	6/14	6/14	2/11	3/11	1/8	1/8	0/10	0/10
	42,9% ^a	42,9% ^a	20% ^{ab}	27,3% ^{ab}	12,5% ^{ab}	12,5% ^{ab}	0% ^b	0% ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

Nestes resultados, através da análise de regressão linear múltipla, houve efeito significativo do tratamento sobre a taxa de prenhez ($p = 0,0450$).

Numa segunda análise por regressão logística simples, o efeito de lavar ou não o útero após a inseminação, independente do tratamento, apresentou influência positiva na taxa de prenhez ($p = 0,0097$), demonstrando que a lavagem uterina possui influência sobre a fertilidade. Foram utilizados 50 ciclos de jumentas, as quais tiveram os úteros lavados pós inseminação, resultando em 17 prenhez (34,0%), e quando o útero não foi lavado ($n=36$), houve apenas 5,5% de prenhez. Nessa mesma análise foi obtido um *Odds ratio* (razão de possibilidade) de 0,1142, demonstrando que o procedimento de lavagem uterina pós inseminação aumentou em 8,7 vezes a chance de prenhez em jumentas.

Realizando a mesma análise por regressão logística simples, para se avaliar a influência da adição do plasma seminal, demonstrou que o mesmo não influenciou nas taxas de fertilização ($p = 0,6582$).

4. DISCUSSÃO

A resposta inflamatória uterina é uma das principais causas da redução da taxa de prenhez em jumentas inseminadas com sêmen congelado [7].

O plasma seminal desempenha um papel importante para células espermáticas, funcionando como um veículo para os espermatozóides [10]. Já que todas as inseminações do presente estudo foram realizadas no corpo uterino, o plasma seminal deve ter contribuído como veículo para as células germinativas chegarem ao oviduto. No entanto, Robertson [14] diz que o plasma seminal não é necessário para a fertilização, porém é um meio que facilita as interações entre o útero e os gametas masculinos, maximizando assim a probabilidade de concepção.

Mesmo demonstrado estatisticamente ($p > 0,05$) que o plasma seminal não influenciou nas taxas de fertilização ($p = 0,6582$), números consideráveis de concepção para a espécie asinina foram obtidos quando utilizado esse componente seminal nas inseminações (12,5% e 42,9% quando associado a lavagem uterina), Andrade et al. [19] descreveram que o plasma seminal contém mecanismos antioxidantes que impedem os efeitos nocivos do estresse oxidativo de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são capazes de afetar negativamente a função espermática [20].

Miró et al. [17] constataram que a presença do plasma seminal em amostras de sêmen fresco de jumentos foi responsável pela redução da resposta inflamatória, devido a observações *in vitro* de supressão da ligação dos espermatozóides com PMN's. No entanto, Rota et al. [5] relataram uma maior reação inflamatória no grupo de jumentas inseminadas com plasma seminal, uma vez que Troedsson et al. [16] sugeriram que a presença de

bactérias ou produtos inflamatórios é incompatível com a sobrevivência do embrião. Observando esses estudos, a lavagem uterina realizada no pico da reação inflamatória (10h após inseminação), que segundo Troedsson et al. [16], ocorre entre 6-12h pós inseminação, devem ter contribuído com a remoção mecânica dos PMN's através do lavado. No presente trabalho com a lavagem uterina obteve-se 20% (2/11) e 27,3% (3/11) de prenhez, respectivamente para BC+L e IC+L, corroborando com os dados de Rota et al., [5], que foram de 20% (1/5). Ainda, Hammadeh et al. [21] afirmaram que os efeitos deletérios de EROS também podem impactar no período pós-fertilização, prejudicando a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário normal com aumento da produção de EROS pelo próprio embrião. Portanto, observa-se no presente estudo a redução das taxas de fertilidade associada a não lavagem uterina nos grupos G5 e G6 (1/8, 12,5%) e ainda G7 e G8 (0/10, 0%), sendo a lavagem uterina podendo atuar benéficamente na remoção, ou pelo menos na diminuição de EROS.

Segundo Vilés et al. [7] quando as células epiteliais do colo uterino e do endométrio entram em contato com o sêmen, citocinas pró-inflamatórias, tais como as prostaglandinas são produzidas, principalmente através da ação da enzima COX-2 na síntese da cascata do ácido araquidônico.

Vilés et al. [7] observaram grande concentração de COX-2 no útero de jumentas inseminadas com sêmen congelado asinino sem adição de plasma seminal, quando comparadas aos grupos que não foram inseminadas ou que foram inseminadas com acréscimo de plasma seminal. Esse resultado sugere que em éguas e jumentas, o plasma seminal em vez de exercer um efeito direto sobre a infiltração precoce de PMN, apenas encurta o período de

inflamação por bloquear a síntese de prostaglandinas e a quimiotaxia de PMN, reduzindo a amplitude dos sinais primários de inflamação, como ocorre após a administração de inibidores da COX-2. Sendo assim, a remoção mecânica dos PMN's no pico inflamatório, e também dos possíveis espermatozóides não sobreviventes através da lavagem uterina, impediria o acontecimento da quimiotaxia, e contribuiria para os resultados satisfatórios de concepção para espécie asinina (6/14, 42,9%).

Contudo, concluímos que foi verificado o efeito de lavar ou não o útero após a inseminação, independente do tratamento, o resultado obteve influência positiva na taxa de prenhez ($p = 0,0097$), demonstrando que a lavagem uterina possui influência na concepção, e uma razão de possibilidade de 0,1142, demonstrando que o procedimento de lavagem uterina pós inseminação aumenta em 8,7 vezes a chance de prenhez em jumentas. No entanto, é necessário a realização de mais inseminações e pesquisas para verificar a constância dos resultados e melhorar os índices de fertilidade na espécie asinina com o uso dessa biotecnologia.

5. REFERÊNCIAS

- [1] WATSON, P.F., GREEN, C.E., Cooling and capacitation of boar spermatozoa: what do they have in common? Boar Semen Preservation, 2000; Vol. IV, 53–60.
- [2] OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M; MACEDO, L.M.; DELL'AQUA Jr, J.A.; PAPA, F.O.,. Effect of cryoprotectant on donkey sêmen freezability and fertility. Animal Reproduction Science 2006; 94: 82-84.
- [3] ROTA A, MAGELLI C, PANZANI D, CAMILLO F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. Theriogenology 2008; 69:176-185.
- [4] VIDAMENT M, VINCENT P, MARTIN FX, MAGISTRINI M, BLESBOIS E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. Anim Reprod Sci 2009; 112:22–35.
- [5] ROTA A, PANZANI D, SABATINI C, CAMILO F. Donkey jack (*Equus asinus*) sêmen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. Theriogenology 2012; 78: 1846–1854.

[6] SABATINI C, MARI G, MISLEI B, LOVE CC, PANZANI D, CAMILLO F, ROTA A. Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (*Equus asinus*) spermatozoa. Reprod Dom Anim 2014; 49:989-994.

[7] VILÉS K, RABANAL R, RODRÍGUEZ-PRADO M, MIRÓ J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. Animal Reproduction Science 2013; 143:57-63.

[8] OLIVEIRA J, OZANAM F, MONTEIRO J, MARINI C. ALVARENGA M. Nascimento do primeiro jumento a partir de espermatozóides congelados no Brasil. In: Proceedings of the XII ABRAVEQ Annual Conference, Campinas, Sao Paulo, Brasil. The Brazilian Association of Equine Practitioners 2011:203.

[9] TROEDSSON MH, DESVOUSGES A, ALGHAMDI AS, DAHMS B, DOW CA, HAYNA J, VALESCO R, COLLAHAN PT, MACPHERSON ML, POZOR M, BUHI WC. Compnents in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. Animal Reproduction Science 2005; 89:171-186.

[10] MANN T. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. Int J Fertil 1978; 23:133–137.

[11] MAXWELL WMC, DE GRAAF SP, GHAOUI RE-H, EVANS G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. Soc Reprod Fertil Suppl 2007; 64:13–38.

[12] MUIÑO-BLANCO T, PÉREZ-PÉ R, CEBRIÁN-PÉREZ JA. Review Article: Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reprod Dom Anim 2008; 43 (suppl. 4):18-31.

[13] SERRES C, RODRIGUEZ A., ALVAREZ AL, SANTIAGO I, GABRIEL J, GÓMEZ-CUÉTARA C, MATEOS E. Effect of centrifugation and temperature on motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. Theriogenology 2002; 58:329–332.

[14] ROBERTSON, S.A. Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. J. Anim. Sci 2007; 85:36–44.

[15] MONTEIRO GA. Criopreservação e fertilidade de espermatozóides do ejaculado e recuperados da cauda do epidídimo de garanhões sub férteis. 2013. 263 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu; 2013.

[16] TROEDSSON MH, LOSET K, ALGHAMDI AM, DAHMS B, CRABOB G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. Anim Reprod Sci 2001; 68:273–278.

- 424 [17] MIRÓ J, VILÉS K, GARCÍA W, JORDANA J, YESTE M. Effect of donkey
425 seminal plasma on sperm movement and sperm-polymorphonuclear
426 neutrophils attachment in vitro. *Animal Reproduction Science* 2013; 140:164-
427 172.
- 428
- 429 [18] LEY, W.B., *et al.* Endometrium. In: Cowell, R. I.; Tyler, R. D _____. *Diagnostic*
430 *cytology and hematology of the horse*. 2.nd.ed. St Louis: Mosby, 2002. p.181-
431 187. Chap. 12.
- 432
- 433 [19] ANDRADE AFC, ZAFFALON FG, CELEGHINI ECC, NASCIMENTO J,
434 BRESSAN FF, MARTINS SMMK, ARRUDA RP. Post-thawed addition of seminal
435 plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved
436 equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. *Sci Verso Science Direct,*
437 *Theriogenology* 2012; 77:1866-1872.
- 438
- 439 [20] AGARWAL A, SALEH RA. Role of oxidants in male in fertility: rationale,
440 significance and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29:817–827.
- 441
- 442 [21] HAMMADEH ME, RADWAN M, AL-HASANI S, MICU R, ROSENBAUM P,
443 LORENZ M, SCHMIDT W. Comparison of reactive oxygen species
444 concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant
445 and nonpregnant patients after IVF/ICSI. *Reprod BioMed Online* 2006; 13,n.5:
446 696–706.