

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA QUALIDADE E
FERTILIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE JUMENTO PÊGA
(*Equus asinus*)**

MARIANA LUIZA MEZZENA GOBATO

Botucatu – São Paulo

Julho/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA QUALIDADE E
FERTILIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE JUMENTO PÊGA
(*Equus asinus*)**

MARIANA LUIZA MEZZENA GOBATO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu – São Paulo

Julho/2020

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-CRB 8/5651

Gobato, Mariana Luiza Mezzena.

Efeito de diferentes diluentes na qualidade e fertilidade do sêmen refrigerado de jumento pêga (*Equus asinus*) / Mariana Luiza Mezzena Gobato. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Asinino. 2. Preservação do sêmen. 3. Gema de ovo. 4. Criopreservação.

Palavras-chave: Asinino; Caseína; Gema de ovo; Leite desnatado; Refrigeração.

Nome do autor (a): Mariana Luiza Mezzena Gobato

Título: EFEITO DE DIFERENTES DILUENTES NA QUALIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE JUMENTO PÊGA (*Equus asinus*)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Central de Reprodução Equina Lub-Breeding – Cesário Lange / SP

Data da Defesa: 30 de julho de 2020.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Francisco e Marilu, pelo amor
incondicional, por serem meu porto
seguro e maiores exemplos. Meu
irmão **Luiz Guilherme**, por ser a
pessoa que me inspira
profissionalmente.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de chegar até aqui.

Aos meus pais, **Francisco Luis Gobato e Maria Luiza Mezzena Gobato**, por serem meu porto seguro e por todo carinho, dedicação, renúncia e muito amor. Sem vocês nada disso seria possível. Sou grata por ter os melhores do mundo. Amo vocês!

Ao meu irmão, **Luiz Guilherme Mezzena Gobato**, que mesmo longe sempre me incentivou e apoiou. Você e a Stephanie Ferreira Vicente são meus maiores exemplos de foco e determinação.

Aos meus avós, que sempre foram como pais e mães. Gratidão por tudo que fizeram e fazem por mim.

A todos os meus familiares que me ensinam diariamente o verdadeiro sentido de respeito, paciência e compaixão. Cada um de vocês têm um lugar muito especial no meu coração.

Ao meu noivo Rafael Bandeira por ser meu confidente. Agradeço todo amor, companheirismo, paciência e dedicação. Sempre serei grata por tudo que faz para me ver feliz. Este momento é nosso. Te amo!

Especialmente àquela que se faz presente todos os dias em meu coração. Ela que sempre esteve ao meu lado e me apoiou em todas as decisões. Sandra Mezzena, você não imagina como sou grata a ti e a falta que me faz!

A todos os meus amigos, em especial Amanda Campolim e Lucas Dibbern, que sempre me motivam a ser alguém melhor, me apoiam e me fazem acreditar que ainda podemos confiar nas pessoas.

Aos colegas e amigos do CERAN, em especial Verônica Scheeren, pelo incentivo, apoio, paciência e amizade durante todo este período. Todos vocês foram muito importantes para a realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

Ao meu orientador Frederico Ozanam Papa, por todas as oportunidades que me proporcionou e por todos os ensinamentos repassados até hoje. Saiba que tenho enorme consideração pelo profissional e homem íntegro que és. Te admiro e serei eternamente grata pela confiança a mim depositada!

Aos professores e funcionários do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da Unesp – Botucatu por toda ajuda, amizade e consideração que

têm por mim. Levarei para sempre em meu coração!

Agradeço a toda equipe do criatório Ximbó pela oportunidade, confiança e colaboração para a realização deste trabalho.

A minha amiga Mayara Peron, pelo primeiro contato com asininos e toda ajuda a mim dispensada.

A todos os animais que participaram deste experimento. Por vocês dedico o meu melhor todos os dias. Obrigada!

A CNPq, pelo apoio fornecido em forma de bolsa de estudos.

A empresa Botupharma e todos os seus funcionários, especialmente José Antônio Dell'Aqua Jr, por todo material cedido e apoio para que este estudo pudesse se concretizar.

A FMVZ Unesp Botucatu por toda estrutura e suporte.

Enfim, agradeço a todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização e sucesso deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Média e erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, avaliados por método computadorizado CASA no momento T0 (T0). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.....	54
TABELA 2. Média e erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, avaliados por método computadorizado CASA após 24 horas de refrigeração (T24). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.....	54
TABELA 3. Média e erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, avaliados por método computadorizado CASA após 48 horas de refrigeração (T48). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.....	54
TABELA 4. Média \pm erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana, produção de H_2O_2 e O_2^- intracelular e potencial mitocondrial em T0. Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.....	55
TABELA 5. Média \pm erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana, produção de H_2O_2 e O_2^- intracelular e potencial mitocondrial, após 24 horas de refrigeração (T24). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.....	56
TABELA 6. Média \pm erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana, produção de H_2O_2 e O_2^- intracelular e potencial mitocondrial, após 48 horas de refrigeração (T48). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.....	56
TABELA 7. Taxa de fertilidade do sêmen asinino diluído em leite desnatado, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal e refrigerado por 24 horas.....	57

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

FIGURA 1 - Estrutura do espermatozoide.....20

FIGURA 2 - Mecanismo de proteção da gema de ovo e do leite desnatado.....30

Capítulo 2

FIGURA 1 - Delineamento experimental do processamento das amostras.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MPE	membrana plasmática estável
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
HPM	potencial mitocondrial total
MT	motilidade total
MP	motilidade progressiva
RAP	espermatozoides rápidos
pH	potencial hidrogeniônico
DNA	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
HSP	proteínas do plasma seminal equino
BSP	proteínas do plasma seminal bovino
EROS	espécies reativas ao oxigênio
CAT	catalase
SOD	superóxido dismutase
GPX	glutathione peroxidase
GSR	glutathione reductase
LDL	lipoproteínas de baixa densidade
SP-1	proteínas 1 do plasma seminal
CRISP3	proteína secretora rica em cisteína 3

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	14
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 Características físicas, comportamentais e reprodutivas de asininos.....	16
1.2 Estrutura espermática.....	18
1.3 Plasma seminal.....	20
1.4 Refrigeração de sêmen asinino.....	24
1.4.1 Visão geral.....	24
1.4.2 Efeitos da refrigeração sobre os espermatozoides.....	24
1.4.3 Sistemas de refrigeração e transporte de sêmen.....	26
1.5 Meios diluentes.....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
REFERÊNCIAS	32
HIPÓTESE	43
OBJETIVOS	43
CAPÍTULO 2	44
ARTIGO: EFEITO DE DILUENTES A BASE DE LEITE DESNATADO, CASEÍNA E GEMA DE OVO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E FERTILIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE JUMENTO PÊGA COM OU SEM PLASMA SEMINAL	45

GOBATO, M.L.M. Efeito de diferentes diluentes na qualidade e fertilidade do sêmen refrigerado de jumento Pêga (*Equus asinus*). 2020. 66p.

RESUMO

Frente aos resultados menos expressivos no uso de sêmen refrigerado e o interesse no comércio de muares, o aprimoramento das biotecnologias é um passo importante para a espécie asinina. Dentre os principais fatores relacionados com o sucesso no uso do sêmen refrigerado destaca-se a presença do plasma seminal e a composição do diluente utilizado para garantir a viabilidade espermática durante o processo de fertilização. Os objetivos do presente estudo visam avaliar o efeito de três diluentes sobre a qualidade do sêmen asinino, com ou sem plasma seminal, bem como os efeitos da fertilidade *in vivo*. Foram utilizados 2 ejaculados de 6 jumentos da raça Pêga, entre 4 e 12 anos. Cada ejaculado foi diluído em meios comerciais a base de leite desnatado (BotuSêmen Special[®]), caseína (BotuSêmen Gold[®]) e gema de ovo (BotuCrio[®]) e as amostras processadas na presença e remoção de plasma seminal, conforme os 6 tratamentos: leite, caseína e gema de ovo com plasma na concentração de 50 milhões de espermatozoides/mL; leite, caseína e gema de ovo centrifugado e ressuspendido na concentração de 100 milhões de espermatozoides/mL. As amostras foram avaliadas a fresco (T0), 24 (T24) e 48 (T48) horas pós-refrigeração. Os parâmetros avaliados foram: cinética espermática pelo método computadorizado CASA e desestabilização da membrana, produção de espécies reativas ao oxigênio e atividade mitocondrial por citometria de fluxo. Para o teste de fertilidade foram utilizados 6 ciclos de 15 éguas em sistema *crossover* e um jumento Pêga com fertilidade comprovada. O diluente à base de leite apresentou resultados inferiores para motilidade total (MT), progressiva (MP) e rápidos (RAP) sem plasma seminal em todos os momentos avaliados e maior produção de ânion superóxido em T48, na presença do plasma seminal ($P < 0,05$). Já o meio à base de caseína sem plasma seminal, apresentou resultados superiores para todos os parâmetros avaliados em todos os momentos ($P < 0,05$), com exceção dos valores de desestabilização de membrana em T24 que não apresentou diferença significativa. Os resultados com meio à base de gema de ovo não sofreram efeito do plasma seminal e também mostraram-se superiores, com exceção de MP e RAP em T48 ($P < 0,05$). A caseína e a gema de ovo apresentaram elevada taxa de

fertilidade tanto com (73% vs 93%) quanto sem plasma seminal (93% vs 73%), respectivamente. Já o leite desnatado apresentou valores similares sem plasma seminal (60%), porém diferiu estatisticamente na presença de plasma (20%). Conclui-se que apesar de demonstrar resultados satisfatórios na refrigeração do sêmen equino, o leite desnatado apresenta pior interação com o sêmen asinino refrigerado. Já a gema de ovo e a caseína, demonstraram ser as melhores alternativas para a refrigeração de sêmen asinino por até 48 horas.

Palavras-chave: asinino; refrigeração; caseína; gema de ovo; leite desnatado.

GOBATO, M.L.M. Effect of different extenders on the quality and fertility of cooled-preserved Pêga donkey spermatozoa (*Equus asinus*). Botucatu – SP. 2020. 66p.

ABSTRACT

In view of the less expressive results using cooled semen and the interest in breeding mules, the improvement of biotechnologies is an important step for the donkey species. Among the main factors related to the successful use of cooled semen, the presence of seminal plasma and the composition of the extender used to guarantee sperm viability during the fertilization process stands out. The aims of this study were to evaluate the effect of three extenders on the quality of donkey semen, with or without seminal plasma, as well as the effects of *in vivo* fertility. Two ejaculates from 6 donkeys of the Pêga breed (4 -12y), were used. Each ejaculate was extended in commercial extender based on skimmed milk (BotuSemen Special®), casein (BotuSemen Gold®) and egg yolk (BotuCrio®) and the samples processed in the presence and removal of seminal plasma, according to the 6 treatments: milk, casein and egg yolk with plasma at a final concentration of 50 million sperm per mL; milk, casein and egg yolk centrifuged and resuspended at a final concentration of 100 million sperm per mL. The samples were evaluated fresh (T0), 24 (T24) and 48 (T48) hours after refrigeration. The parameters evaluated were: sperm kinetics by the CASA and membrane destabilization, reactive oxygen species production and mitochondrial activity by flow cytometry. For fertility test, 6 cycles of 15 mares were used in a *crossover* system and semen from a Pêga donkey with proven fertility. Milk-based extender had lower results for total (TM), progressive (PM) and rapid (RAP) motility without seminal plasma at all evaluated times and higher production of superoxide anion in T48, in the presence of seminal plasma ($P < 0.05$). Casein-based extender without seminal plasma had superior results for all parameters evaluated at all times ($P < 0.05$), except for the values of membrane destabilization at T24, with no statistical difference. Results of egg yolk-based extender were not affected by seminal plasma and were also superior, with the exception of PM and RAP at T48 ($P < 0.05$). Casein and egg yolk had a high fertility rate with (73% vs 93%) and without seminal plasma (93% vs 73%), respectively. On the other hand, skimmed milk had similar values without seminal plasma (60%), but it differed statistically in the presence of

plasma (20%). In conclusion, despite satisfactory results for equine cooled semen, skimmed milk extender had a worse interaction with donkey cooled semen. Egg yolk and casein proved to be the best alternatives for cooling donkey semen for up to 48 hours.

Keywords: asinine; cooled semen; casein; egg yolk, skimmed milk.



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O setor de equideocultura que reúne equinos, muares e asininos é uma importante cadeia do agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque no cenário mundial. Apesar de consolidado o princípio de que uma boa eficiência reprodutiva é fundamental para qualquer sistema de criação, o processo de seleção no rebanho equídeo ainda se dá principalmente por desempenho esportivo (BRITO, 2007).

Os asininos são criados e reconhecidos mundialmente e, especialmente no Brasil, assumem interesse particular no cruzamento com éguas para a criação e comércio de muares. O crescente interesse na criação de híbridos (burro/mula) é devido à sua capacidade de agregar em um único exemplar, a agilidade da espécie equina com características de força e resistência da espécie asinina. Embora pouco frequente, a utilização e transporte do sêmen refrigerado é uma técnica em expansão na criação de asininos (CANISSO, 2010).

Apesar do sêmen fresco apresentar excelentes resultados de fertilidade, o aprimoramento da biotécnica de refrigeração possui inúmeras vantagens. A colheita e o transporte do sêmen minimizam o risco de acidentes durante o processo de monta natural e evita a propagação de doenças sexualmente transmissíveis pela cópula. Ademais, é possível otimizar o serviço dos reprodutores, bem como o número de produtos nascidos, permitindo a disseminação de material genético de animais superiores e a transposição de barreiras geográficas, minimizando o risco de endogamia no criatório (MOORE et al., 2005).

Apesar dos avanços, existe ainda disparidade entre ganhões em relação à crioresistência espermática, sendo um dos possíveis fatores envolvidos a presença/ausência do plasma seminal. Devido a variabilidade de sua composição, os efeitos do plasma seminal sobre os espermatozoides equinos são conflitantes. Neste contexto, vários estudos foram conduzidos a fim de identificar a real interação e os potenciais efeitos benéficos e danosos do plasma seminal sobre a qualidade espermática em ganhões, pois reflete diretamente nos índices de fertilidade do plantel (BRINSKO et al., 2000). Além disso, independente da espécie, existem indivíduos mais sensíveis ao processo de refrigeração espermática, o que dificulta ou impossibilita o transporte de sêmen destes animais (HARTWIG et al., 2014).

Do mesmo modo, a temperatura de armazenamento e a composição do diluente também são fatores diretamente relacionados com o sucesso no uso do sêmen refrigerado.

Para a manutenção da viabilidade espermática em temperaturas reduzidas, se faz necessário o uso de substâncias capazes de interagir com os espermatozoides conferindo padrões adequados de cinética e estabilidade da membrana espermática (PUGLIESI, 2009). Neste sentido, pesquisas vêm sendo desenvolvidas há várias décadas, preconizando-se o uso de diluentes comerciais cujas bases são leite desnatado e gema de ovo nos processos de refrigeração e congelação de sêmen equídeo, respectivamente (ZAHN; PAPA; DELL'AQUA JR, 2002; PAPA et. al, 1998; PAPA et. al, 2002).

Como trata-se de produtos de origem animal, de composição variável, estudos relacionados às frações específicas do leite, tais como as caseínas, estão sendo desenvolvidos no sentido de padronizar lotes de diluentes destinados à exportação, transpor barreiras sanitárias, bem como reduzir interações indesejáveis com substratos presentes no leite, reduzindo as crioinjúrias. Além disso, pesquisas comprovaram que a caseína apresenta índices de fertilidade superiores àqueles observados utilizando-se diluentes a base de leite desnatado, principalmente em equinos sensíveis ao processo de refrigeração (CAMPOS et al, 2020).

No entanto, existem poucos estudos específicos sobre refrigeração de sêmen asinino, sendo os meios diluentes e protocolos utilizados os mesmos empregados para a espécie equina (CANISSO et al., 2008b). Por este motivo, o objetivo desta revisão é esclarecer algumas particularidades do comportamento reprodutivo de asininos, bem como suas características seminais e o desempenho do sêmen frente às bases diluentes disponíveis para refrigeração.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Características físicas, comportamentais e reprodutivas de asininos

Apesar de possuírem algumas semelhanças físicas e alto grau de parentesco, asininos e equinos não possuem as mesmas características. Dentre as principais diferenças, os jumentos apresentam o tamanho desproporcional das orelhas, a morfologia dos cascos predominantemente encastelados e pequenos, resistência a endo e ectoparasitas e alta capacidade de conversão alimentar, originários de regiões de clima árido e semiárido, o que lhes confere maior rusticidade e adaptabilidade a serviços longos e rotineiros. Além disso, são animais dóceis, extremamente inteligentes e atualmente, muito valorizados em concursos de marcha e cavalgadas (ARAÚJO, 2010).

Quanto à organização social e sexual dos asininos, os machos assumem domínio do tipo territorial, exercendo influência em área limitada, enquanto que os equinos organizam-se em haréns, ou seja, um único garanhão tem domínio sobre várias fêmeas, independente do território em que estão localizadas (HENRY et al., 1991; McDONNELL, 1998; HENRY et al., 2009).

Além do tempo de cortejo prolongado, variando entre 5 a 40 minutos para a excitação pré-copulatória (GASTAL et al., 1996; CANISSO et al., 2008a), o comportamento sexual é peculiar da espécie. No geral, os machos vocalizam atraindo as fêmeas, se aproximam e após executar diversos saltos sem ereção ou exposição parcial do pênis, afastam-se. À distância, apesar de aparentemente apresentarem desinteresse pela fêmea, continuam se estimulando até uma nova aproximação e então, expõem o pênis, montam e efetuam a cópula. O garanhão, por sua vez, não se afasta da fêmea após o contato inicial sem que tenha sido executada a monta (HENRY et al., 2009).

Convém destacar que a grande maioria dos profissionais ignoram a importância de se respeitar o tempo e o comportamento de cortejo sexual inerentes à espécie asinina. O fato de asininos pertencerem ao mesmo grupo taxonômico dos equinos, não justifica generalizá-los quanto ao comportamento e manejo sexual, o que se torna um desafio no sistema intensivo de criação (TIBARY, 2007).

Por apresentarem longos tempos de estimulação (McDONELL, 1998), a maioria dos profissionais se frustram durante a colheita de sêmen e acabam sub julgando erroneamente e até condenando alguns reprodutores devido ao manejo inadequado e, conseqüentemente, reduzem as taxas de sucesso no programa reprodutivo adotado no criatório. Vale ressaltar também que, assim como garanhões, são animais altamente treináveis para colheita com vagina artificial (CANISSO; McDONELL, 2010). O sêmen pode ser utilizado a fresco ou refrigerado em programas de inseminação artificial com diluentes a base de leite desnatado e, se manejados adequadamente, apresentam excelentes índices reprodutivos em criação intensiva (PUGH, 2016).

Quanto aos parâmetros espermáticos, poucos estudos específicos sobre o sêmen de asininos foram conduzidos. Comparando-se os estudos de Morais et al. (1994a) e Canisso et al. (2010), onde avaliaram as características físicas e morfológicas do ejaculado de asininos da raça Pêga, os valores médios encontrados foram: volume total ($59,88 \pm 15,54\text{mL}$), volume de gel ($8,19 \pm 4,07\text{mL}$), motilidade espermática total ($83,11 \pm 6,15\%$), motilidade progressiva ($73,6 \pm 7,3\%$), vigor espermático ($4,33 \pm 0,49$), concentração espermática ($440 \pm 190 \times 10^6$), total de espermatozoides por ejaculado ($19,90$

$\pm 9,59 \times 10^9$), total de defeitos espermáticos ($15,60 \pm 3,62\%$), defeitos maiores ($8,55 \pm 2,14\%$) e defeitos menores ($7,04 \pm 2,56\%$).

No geral, apesar de sofrerem variações e considerando as diversidades raciais, os dados relatados para a espécie asinina descrevem concentração espermática por mL e número total de espermatozoides por ejaculado mais altas que as observadas para equinos (GASTAL, 1991; MORAIS et al., 1994a; MIRÓ et al., 2005; ROSSI, 2008). Já a porcentagem de células anormais é relativamente baixa em asininos, por volta de 16% na maioria dos estudos (HENRY et al., 1987; MORAIS et al., 1994b; GASTAL et al., 1997). Quanto a cinética espermática, constatou-se que os asininos apresentam, de modo geral, ejaculados de melhor qualidade (MORAIS et al., 1994b; ROSSI, 2008; CANISSO et al., 2010), já o pH do sêmen situa-se entre 6,8 e 8,0 (MORAIS et al., 1994b; GASTAL et al., 1997; MIRÓ et al., 2005), similar ao do equino que varia entre 7,2 e 7,6 (KENNEY, 1983). Morais (1994b) descreve ainda valores de pH e osmolaridade entre 7 a 7,8 e 273mOsm, respectivamente, avaliando-se o ejaculado de seis jumentos da raça Pêga.

Devido à semelhança entre as características seminais de asininos e equinos, acredita-se que os métodos empregados para a criopreservação do sêmen possam, a princípio, serem os mesmos (MORAIS et al., 1994a). Está claro que a composição e as características do sêmen variam entre as espécies e entre indivíduos de uma mesma espécie. Fatores como idade, tamanho de testículo, nutrição, frequência de ejaculações e até variações climáticas podem afetar parâmetros seminais (MAIA; BICUDO, 2009). Contudo, somente por estudos complementares poderão confirmar a viabilidade destes procedimentos.

1.2 Estrutura espermática

Por se tratar de uma célula eucarionte, o espermatozoide dos mamíferos é estruturalmente formado por um núcleo bem definido e completamente envolto por membrana nuclear, que agrega componentes intracelulares e organelas, mantendo a homeostase e integridade celular por meio de sua permeabilidade interna (GADELLA et al., 2001; TOSHIMORI; ITO, 2003; RUIZ-PESINI et al., 2007). É uma célula altamente especializada cuja única função é a fecundação do oócito, unindo assim o material genético masculino com o feminino, formando o embrião (VARNER et al., 2015). É dividido em três segmentos principais: cabeça, peça intermediária e cauda, no qual cada

um desenvolve uma série de funções específicas a nível celular e molecular no processo de fertilização (LADHA, 1998; ALMEIDA, 2006; VARNER et al., 2015).

A cabeça do espermatozoide contém o núcleo, que abriga o material genético celular na forma de cromatina condensada, composto por ácido desoxirribonucleico (DNA) e protaminas (TOSHIMORI; ITO, 2003; RUIZ-PESINI et al., 2007). Como nos equinos, possui formato oval e alongada, sendo recoberta por uma estrutura denominada acrossoma. Este, é composto por uma bicamada contendo as enzimas acrosina, e hialuronidase, essenciais para a penetração do espermatozoide no oócito durante a fecundação (BRITO, 2007).

Entre a cabeça e a cauda existe uma estrutura denominada peça intermediária, composta por uma bainha de mitocôndrias em formato helicoidal (PESCH; BERGMANN, 2006). É responsável pelo fornecimento de energia celular, permitindo a movimentação flagelar pela produção de ATP (adenosina trifosfato) (CÂMARA; GUERRA, 2008).

A cauda ou flagelo é dividida em duas partes: peça principal e peça terminal. Em sua porção principal é constituída por uma bainha fibrosa composta por um par de microtúbulos central, nove pares de microtúbulos periféricos e nove fibras densas. Esta organização se altera à medida que se aproxima de sua porção terminal, restando apenas microtúbulos ligados por dineínas. A principal função da cauda é proporcionar movimento ao espermatozoide através do deslocamento dos microtúbulos a partir da energia gerada pela produção de ATP (BRITO, 2007; RUIZ-PESINI et al., 2007; VARNER et al., 2015).

A estrutura do espermatozoide, apesar de aparentemente simples, é revestida por uma membrana plasmática complexa, formada por bicamada lipídica e composta por fosfolipídeos, glicolipídeos, colesterol e proteínas de membrana (ALBERTS et al., 1999). Possui um mecanismo altamente sofisticado, funcional e adaptável aos processos de criopreservação e fertilização (VARNER et al., 2015).

Estudos comparando espermatozoides de asininos e equinos, demonstraram maior ocorrência de inserção abaxial da peça intermediária (EL WISHY, 1974) e cabeça de tamanho maior e formato mais arredondado em espermatozoides asininos. Apesar de cada espécie apresentar morfologia espermática distinta, parte da literatura descreve não haver diferença na estrutura dos espermatozoides asininos quando comparados aos equinos (LAUNAY, 1990) (Figura 1).

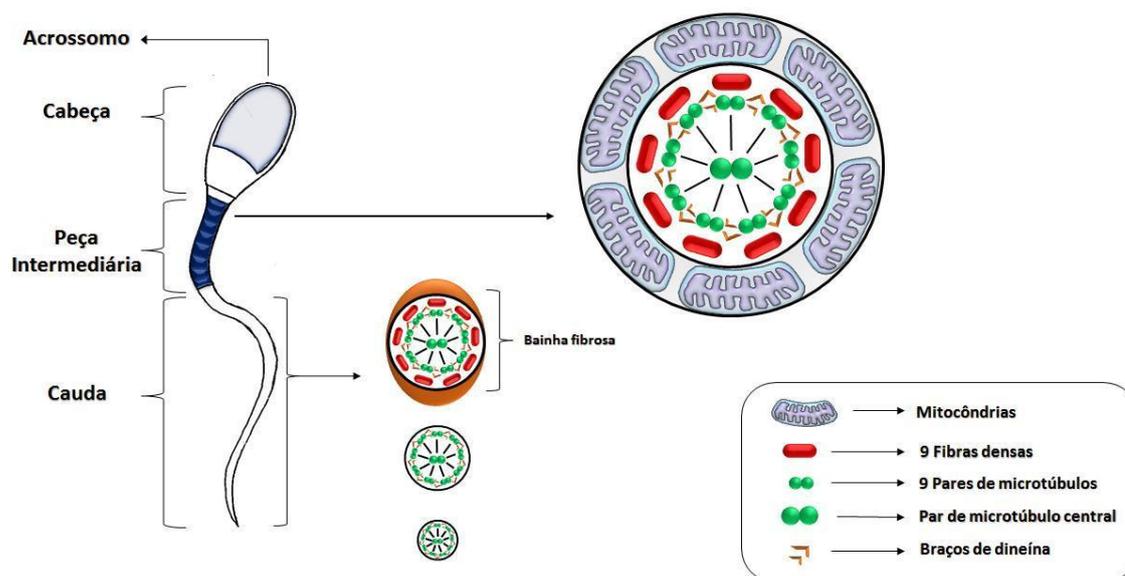


FIGURA 1. Estrutura do espermatozoide (ARAÚJO et al., 2017).

1.3 Plasma Seminal

Além dos espermatozoides, o ejaculado é composto por uma porção fluida proveniente majoritariamente de secreções das glândulas acessórias, de composição variada, denominada plasma seminal. Os espermatozoides são produzidos no testículo durante a espermatogênese e durante a ejaculação, entram em contato com o plasma, que promove importantes mudanças na composição da membrana espermática e proteínas de superfície, essenciais para a fertilização (LEEB et al., 2005).

Embora o plasma seminal constitua quase que a totalidade do ejaculado, trabalhos sobre a composição proteica deste fluido são escassos na espécie asinina. Avaliando-se o perfil eletroforético de proteínas do plasma seminal equino (principalmente as HSPs), pesquisadores concluíram que estas possuem propriedades biológicas semelhantes às proteínas do plasma seminal de outros mamíferos (BSPs), podendo ser utilizadas como marcadores de fertilidade (BRANDON et al., 1999; KARESKOSKI; KATILA, 2008; NOVAK et. al., 2010). As BSPs entram em contato com os espermatozoides dos mamíferos no momento da ejaculação e modulam a reação de capacitação espermática, fenômeno essencial para a fertilização (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002a). Porém, durante o armazenamento se tornam prejudiciais à medida que mobilizam fosfolipídios e

colesterol da membrana espermática, modificando extensivamente sua composição (MANJUNATH, 2007; BERGERON; MANJUNATH, 2006).

No entanto, a função do plasma seminal ainda é duvidosa e o entendimento total do papel que ele exerce sobre os espermatozoides permanece como um desafio no meio científico. Sabe-se que é formado basicamente por secreções provenientes das glândulas anexas e uma minoria de constituintes de fluidos epididimário e da rede *testis*. Considerando-se esta constituição e visto que os espermatozoides do epidídimo são capazes de fertilizar o oócito sem nenhum contato prévio com as secreções provenientes das glândulas anexas, estudos têm questionado sua necessidade no processo de fertilização (PAPA et. al, 2008; GUASTI, 2010; MONTEIRO, 2011).

A centrifugação do sêmen previamente à congelação é um procedimento padrão usado para concentrar os espermatozoides e remover o plasma seminal e seus possíveis efeitos nocivos (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Apesar da participação dos constituintes do plasma seminal em diversos eventos fisiológicos, a sua presença durante os processos de refrigeração e congelação é controversa, já que alguns estudos demonstraram efeito deletério ao sêmen bovino (MARTINUS et al., 1991; BERGERON et al., 2004) e equino (JASKO et al., 1992; BRINSKO et. al, 2000; MOORE et al., 2005; BRINSKO et al, 2000; ALGHAMDI et al., 2004; BERGERON et al., 2004; MOORE et al., 2005; LOVE et al., 2005; ALMEIDA, 2006; ROTA et al., 2008; MIRÓ et al., 2009).

Rigby et al. (2001) observaram melhora da cinética espermática após remoção parcial do plasma seminal em ganhões considerados bad cooler submetidos a refrigeração convencional (5°C/24-48h). Do mesmo modo, Brinsko et al. (2000) descreveram que a centrifugação e remoção parcial do plasma seminal aumentou a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva e limitou a redução de espermatozoides progressivamente móveis em ganhões que apresentavam resultados inferiores quando seus ejaculados foram submetidos a refrigeração. Isso indica que a centrifugação e remoção parcial do plasma são benéficos para ganhões cujos ejaculados têm pouca tolerância a refrigeração e armazenamento com técnicas tradicionais, especialmente por tempo superior a 24 horas (BRINSKO et al., 2000).

Durante a descongelação, Alghamdi et al. (2004) demonstraram que a adição de plasma seminal em concentração reduzida (<5%) melhora a qualidade seminal e observaram resultados negativos quando houve a remoção total ou adição de altas concentrações (10-30%) de plasma. Moore et al. (2005) também verificaram que a criopreservação de espermatozoides com mais de 20% de plasma seminal reduziu a

sobrevivência espermática.

A centrifugação do sêmen para remoção do plasma seminal previamente a refrigeração tem sido avaliada também na espécie asinina, porém com poucos resultados (SERRES et al., 2002; ROTA et al., 2008; MIRÓ et al., 2009). Este processo apresentou um efeito positivo na motilidade e integridade da membrana plasmática de espermatozoides de jumentos (SERRES et al., 2002). Em estudo relacionado a diluição e centrifugação do sêmen asinino para posterior refrigeração, observou-se que a viabilidade dos espermatozoides após armazenamento foi melhor quando maior a diluição ou quando o plasma seminal foi parcialmente removido por centrifugação (MIRÓ et al., 2009).

No entanto, para a espécie asinina, os efeitos da remoção do plasma seminal antes da refrigeração do sêmen também permanecem controversos, tendo sido observados efeitos benéficos da remoção do plasma em alguns experimentos (DALMAU, 2003; SERRES et al., 2002; MIRÓ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2018), enquanto em outros não observou-se diferenças na qualidade do sêmen armazenado na presença ou ausência do plasma seminal (FERREIRA et al., 1991; ROTA et al., 2008). Rota et al. (2008) descrevem ainda que a retirada do plasma seminal pareceu ser prejudicial à motilidade progressiva às 24 e 48 horas de refrigeração.

Diversos trabalhos demonstram que a criopreservação do sêmen aumenta a produção de EROS (espécies reativas ao oxigênio), induz dano ao DNA espermático e causa rápida perda do potencial fertilizante pela reação de peroxidação lipídica da membrana plasmática (BALL et al., 2001). Uma das hipóteses pode estar relacionada com a retirada do plasma seminal, que confere proteção aos espermatozoides contra o estresse oxidativo (ALMEIDA, 2006; BAUMBER et al., 2003). Neste sentido, agentes antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona redutase) e não enzimáticos (albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina) são encontrados no plasma seminal, a fim de proteger os espermatozoides dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo (BUSTAMANTE FILHO, 2006).

Kankofer et al. (2005) investigaram a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase em sêmen equino refrigerado e observaram que a refrigeração do sêmen por 24 horas a 5°C não alterou a atividade enzimática. Do mesmo modo, a lipoperoxidação permaneceu estável, sugerindo que a atividade das enzimas presentes no plasma inibe a peroxidação dos lipídios da membrana pelas EROS.

Já Papas et. al (2019), comparando a atividade antioxidante das enzimas CAT, SOD, GPX e GSR no plasma seminal de equinos e asininos, relataram que existe grande variabilidade entre as espécies, exercendo maior atividade no plasma de asininos. Apesar de aparentemente as enzimas CAT, SOD, GPX estarem positivamente correlacionadas na promoção da capacidade antioxidante em ambas as espécies, parâmetros de motilidade espermática estão correlacionados positivamente com atividade de CAT e SOD em asininos, porém o mesmo não ocorre em equinos. Neste sentido, há a necessidade de pesquisas mais específicas, bem como a avaliação de antioxidantes não enzimáticos no plasma seminal de asininos para estabelecer seus reais mecanismos de ação e influência sobre os espermatozoides.

Love et al. (2005) constataram que a remoção prévia de plasma seminal do sêmen equino refrigerado por 24-48 horas conferiu proteção à integridade do DNA espermático. Este estudo demonstrou que uma redução na integridade do DNA pode ocorrer apesar da manutenção da motilidade espermática e não sugere que todos os ejaculados resfriados sejam submetidos a centrifugação, mas aqueles que estão sofrendo redução na fertilidade, sim. Além disso, danos ao DNA aumentaram à medida que foi adicionado plasma seminal às amostras, sugerindo que substâncias que compõem o plasma seminal são prejudiciais à integridade do DNA espermático.

Aurich et al. (1996) relataram que a adição de plasma seminal de garanhões de alta congelabilidade ao sêmen de animais de baixa congelabilidade melhorou a resistência às técnicas de criopreservação, ocorrendo o oposto quando se adicionou plasma seminal proveniente de garanhões de baixa congelabilidade. Este estudo comprovou que a variabilidade individual na composição do plasma seminal é um dos fatores determinantes a ser considerado durante um protocolo de congelamento, principalmente em garanhões considerados “bad coolers”. Visto as diferenças individuais quanto à composição e qualidade do plasma seminal, o processo de centrifugação também deve ser considerado na confecção de amostras refrigeradas pois, dependendo do indivíduo, o efeito do plasma pode ser benéfico ou prejudicial.

A grande divergência dos resultados sobre plasma seminal deve-se principalmente à utilização de diferentes metodologias empregadas nas pesquisas, além de fatores como: diluição, temperatura, tempo, método de centrifugação e variação individual afetarem a viabilidade do sêmen criopreservado (KARESKOSKI et al., 2006; GUASTI et al., 2012).

1.4 Refrigeração de sêmen

1.4.1 Visão geral

Várias metodologias vêm sendo testadas para a criopreservação espermática em asininos utilizando diferentes protocolos de centrifugação, curvas de resfriamento e meios diluentes, porém não apresentam números expressivos de estudos ou exploração científica satisfatórios. Embora vários centros de pesquisa desenvolvam estudos nessa área, ainda não há uma metodologia universalmente aceita para essa espécie, utilizando-se dos mesmos protocolos de criopreservação desenvolvidos para equinos (CANISSO et al., 2008b).

No cenário mundial, Brasil e Estados Unidos são os países que mais realizam inseminação artificial com sêmen equino refrigerado transportado atualmente (PAPA et al., 2005). Além de segura e econômica, essa biotécnica evita riscos associados ao transporte de éguas e garanhões e permite ampla disseminação de animais geneticamente superiores pois não necessita que haja contato direto entre macho e fêmea (AVANZI et al., 2006, ROTA et al., 2008). Entretanto, a fertilidade do sêmen e consequentemente as taxas de prenhez diminuem após 24-48hs de refrigeração (AURICH, 2008).

Durante o processo de criopreservação do sêmen em mamíferos, invariavelmente ocorrem danos com extensão variável de acordo com a composição lipídica celular de cada espécie (WATSON, 2000; MACÍAS GARCÍA et al., 2011). Peroxidação lipídica, consumo excessivo de ATP intracelular, danos à membrana espermática e acrossomal, redução do potencial da membrana mitocondrial e redução da motilidade espermática são diferentes tipos de danos criogênicos, e podem ser interdependentes e estar relacionados à produção anormal de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) (GIBB E AITKEN, 2016; GARCIA 2011; PISOSCHI e POP, 2015). No geral, apesar da otimização dos protocolos utilizados, 40% dos espermatozoides não sobrevivem devido os efeitos do estresse osmótico, da curva de refrigeração, da composição dos diluentes utilizados e da susceptibilidade individual ao choque térmico (WATSON, 2000).

1.4.2 Efeitos da refrigeração sobre os espermatozoides

O modelo de organização da membrana plasmática dos espermatozoides é de “mosaico fluido”, no qual a fluidez é determinada pelo deslocamento lateral de moléculas

de proteínas no plano da bicamada lipídica. Os lipídios da membrana espermática de diferentes espécies incluem fosfolipídios, esteróis e glicolipídios, sendo que nos equinos há uma predominância dos fosfolipídios. Esta constituição regula funções específicas da célula, como a capacitação, a reação acrossomal e a ligação entre espermatozoide e oócito (HALL et al., 1991).

À temperatura corpórea normal, o metabolismo espermático é alto e durante a refrigeração, a cada 10°C de queda na temperatura, é reduzido em cerca de 50%, ou seja, à temperatura final de 5°C apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sobrevivência (SQUIRES et al., 1998). No entanto, durante o processo de refrigeração ocorrem mudanças na estrutura das moléculas de fosfolipídios, que impossibilitam a movimentação aleatória das proteínas, resultando em aumento de permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica (AMANN; PICKETT, 1987), crucial para garantir a viabilidade das células espermáticas durante o armazenamento e transporte.

No momento da colheita, a temperatura do sêmen é de aproximadamente 35°C e quando submetido à refrigeração, o espermatozoide passa por uma mudança na organização dos ácidos graxos que altera o estado físico da membrana. Nesse processo, à medida em que há redução da temperatura, os lipídios da membrana passam de um estado fluido, no qual as cadeias de ácidos graxos estão relativamente desorganizadas, para um estado de gel, com as cadeias de ácidos graxos rígidas e paralelas. (AMANN; GRAHAM, 2011). O período de maior sensibilidade das células é o compreendido entre as temperaturas de 19°C e 8°C (MORAN et al., 1992), denominada fase de transição, que é determinante para a qualidade do espermatozoide refrigerado.

No momento da refrigeração, os componentes da membrana são os mais afetados e, quando o sêmen atinge temperaturas de aproximadamente 5°C, esse estado torna a membrana mais susceptível a lesões que, quando ocorrem, resultam em mudanças de permeabilidade associadas a alterações funcionais e metabólicas que prejudicam a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (AMANN; GRAHAM, 2011).

Por sua vez, o colesterol, principal esteroide da membrana plasmática dos espermatozoides está inserido nesta como uma estrutura espiral rígida na bicamada de fosfolipídios, regulando a permeabilidade e estabilidade da membrana (CROSS, 1998). As espécies que apresentam maior concentração de colesterol na membrana dos espermatozoides tendem a ser mais resistentes ao choque frio, podendo fazer com que a fase gel não ocorra, se limitando a um estado fluído intermediário (WATSON, 1981;

CROCKETT, 1998). Contudo o equino não é uma dessas espécies, assim a adição suficiente de colesterol aos diluentes a fim de promover maior proteção de membrana, traz benefícios para aqueles animais que apresentam baixa resistência a refrigeração (HARTWIG et al., 2012; HARTWIG et al., 2014). Kirk et al. (2001) relataram melhora na motilidade espermática ao adicionar colesterol em diluente para refrigeração de sêmen equino durante 24 e 48 horas e incremento em 50% na motilidade espermática após adição de colesterol naqueles animais pouco resistentes ao processo. No entanto, pesquisas relatando o comportamento celular na adição de colesterol ainda não foram conduzidas para a espécie asinina.

Apesar disso, algumas estratégias podem ser adotadas para minimizar os danos causados pela refrigeração, entre elas as taxas de refrigeração e os meios diluidores, que podem conferir maior estabilidade às células, protegendo a membrana e consequentemente a função do espermatozoide.

1.4.3 Sistemas de refrigeração e transporte de sêmen

Existem sistemas ativo e passivo de refrigeração, sendo que no ativo, a curva de decréscimo da temperatura não sofre interferência da temperatura ambiente, é realizada de forma padronizada, porém são caros e de pouca utilidade prática (RAPHAEL, 2007). Por outro lado, apesar do sistema passivo estar sujeito à fatores externos, é o mais utilizado nacional e internacionalmente pois é prático e econômico, uma vez que a curva de refrigeração é feita em caixa térmica, podendo ser de poliestireno, como a Botuflex[®], ou de fibra, como o Equitainer[®] (CANISSO et al., 2008b). Avanzi et al. (2006) compararam os sistemas de refrigeração passiva, disponíveis no mercado – Equitainer[®], Botutainer[®], Max-Semen[®] e Botu-Box[®] – e não observaram diferenças entre eles quando foram mantidos a uma temperatura ambiente de 24° C.

Silva Filho et al. (1994) determinaram que os containers para transporte deveriam atender às seguintes exigências: completo isolamento térmico, ser inócuo para os espermatozoides, permitir taxa de resfriamento lenta, manter a temperatura após estabilização pelo período proposto, possuir estrutura resistente, simples e leve para ser aceito pelos sistemas de transporte aéreo e terrestre, seguro contra violações e condições adversas, ser barato e de fácil manuseio, garantindo maior longevidade e qualidade espermática (SILVA FILHO et al., 1994; BRINSKO et al., 2000). Também devem apresentar suas especificações técnicas como a taxa de refrigeração, temperatura final e tempo máximo de estocagem.

As taxas de refrigeração foram demonstradas por Varner et al. (1988), os quais observaram que estas podem afetar a capacidade de manutenção de motilidade. Kayser et al. (1992) descreveram que entre o intervalo de 37 a 20°C o sêmen pode ser submetido a curva rápida de refrigeração sem efeitos adversos para a motilidade, porém, entre 20 a 5°C (fase de transição) há uma maior sensibilidade da célula às crioinjúrias, portanto, deve-se respeitar uma curva inferior a -0,05°C/min. Moran et al. (1992) estabeleceram o intervalo entre 19 a 8°C como sendo o período crítico no processo de refrigeração e que a partir de 8 até 5°C a curva pode ser rápida. Parece haver um consenso entre os pesquisadores sobre a necessidade de se utilizarem taxas de refrigeração lentas, não superiores a -0,05°C/min entre 19 e 8°C, pois esta é a fase crítica de ocorrência das lesões nas membranas espermáticas, encerrando o arrefecimento de 37°C até 5°C em um período de 4 a 5 horas (KAYSER et al., 1992; MORAN et al., 1992; SQUIRES et al., 1998; AVANZI et al., 2006; AMANN e GRAHAM, 2011).

Ferreira (1993) demonstrou que os componentes do diluente podem modificar o tempo de preservação do sêmen de jumentos *in vitro* dependendo da curva de refrigeração. Foi verificado que não houve diferença na longevidade espermática quando o sêmen diluído em meio à base de leite foi refrigerado a -0,6°C/min., -0,3°C/min. e -0,2°C/min., enquanto a taxa de refrigeração de -0,6°C/min. resultou em maior longevidade, quando o sêmen foi diluído em meio à base de gema de ovo.

A refrigeração nas caixas de poliestireno é amplamente utilizada e tem como fonte de frio o bloco de gelo reciclável, que pode estar em número de um, para se obter temperatura final de 15°C e manutenção desta por até 24 horas, ou de dois, para uma temperatura final de 5°C por até 48 horas de armazenamento. A redução na temperatura do sêmen diminui o metabolismo espermático, reduzindo a formação de espécies reativas de oxigênio, bem como a proliferação bacteriana (AURICH, 2008). No entanto há controvérsias quanto a temperatura ideal para o sêmen equino refrigerado, alguns trabalhos demonstram que a preservação entre 4 a 6°C é mais eficaz na conservação das características seminais e fertilidade (SQUIRES et al., 1988; VARNER et al., 1988; KAYSER et al., 1992), enquanto outros afirmam não haver diferença entre a estocagem a 15 ou 5°C (AVANZI et al., 2006; MACHADO et al., 2002; FARRÁS et al., 2008). Cottorello et al. (2002) citam maior resistência espermática à criopreservação, sobrevivendo às variações de pH ou deficiência energéticas no meio diluente, com notável diferença de longevidade espermática entre o sêmen equino e asinino preservado a 5°C, com superioridade para o último.

Quanto aos índices de fertilidade, os asininos apresentam valores reduzidos quando utilizado sêmen criopreservado, comparado ao uso do sêmen fresco (WATSON, 2000). Vários autores, comparando sêmen refrigerado e congelado, relataram resultados insatisfatórios com sêmen criopreservado na espécie asinina (OLIVEIRA et al., 2006; ROTA et al., 2008). No entanto, Vidament et al. (2009) concluíram que as taxas de prenhez em jumentas e éguas foram similares quando inseminadas com sêmen asinino diluído em leite e refrigerado enquanto, com sêmen congelado, obteve taxa de prenhez de três a quatro vezes maior em éguas quando comparada com jumentas. Por outro lado, Rota et al. (2012), divulgaram índice de 61,5% (8/13) de prenhez em jumentas utilizando sêmen congelado e Oliveira (2015) índice de 42,9% (6/14).

1.5 Meios diluentes

Os meios diluentes são soluções destinadas a proteger os espermatozoides de condições desfavoráveis, bem como prolongar a longevidade durante os processos de refrigeração e transporte do sêmen. Suas principais funções são: reduzir a concentração de plasma seminal, fornecer aporte nutricional, ação antimicrobiana, além de estabilizar o pH e a osmolaridade do ejaculado. Pois, sabe-se que alterações destes indicadores poderão levar a mudanças nas características de cinética e qualidade espermática (PUGLIESI, 2009).

Especificamente no processo de refrigeração, a característica mais importante de um bom diluente é a sua capacidade de estabilizar as membranas durante a fase de transição, momento crítico no qual a maioria das lesões espermáticas ocorrem. Para minimizar os danos causados pelo choque térmico, várias substâncias são adicionadas ao meio diluente que, geralmente, são constituídos por leite e/ou gema de ovo (HEITLAND et al., 1995).

Os diluentes frequentemente utilizados para refrigeração de sêmen equino e asinino são a base de leite e de seus derivados, como a caseína. Eles devem proporcionar uma combinação adequada de nutrientes, possuir osmolaridade compatível com a sobrevivência dos espermatozoides, sem oferecer toxicidade às células. Devem ainda ter a capacidade de neutralizar os catabólitos espermáticos, proteger a célula das variações de temperatura e não irritar o trato reprodutivo da fêmea (SILVA-FILHO, 1994; CANISSO et al., 2008b).

Diluentes que têm como base principal a gema de ovo possuem ação crioprotetora devido à ação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), em especial a lipoproteína 3,

que permanecem firmemente ligadas à membrana dos espermatozoides (FOULKES, 1977), estabilizando-as e neutralizando os potenciais agentes danosos presentes no plasma seminal (AMANN; GRAHAM, 2011). Uma segunda hipótese sugere que a fração fosfolipídica presente no LDL proteja as células por formação de uma película protetora na superfície da membrana (QUINN et al., 1980) ou substituição de fosfolipídios perdidos ou danificados durante a criopreservação (GRAHAM; FOOTE, 1987). Outros autores sugerem que as lipoproteínas da gema de ovo competem com peptídeos catiônicos (<5kDa) prejudiciais do plasma seminal (VISHWANATH; SHANNON; CURSON, 1992). No entanto, em estudo posterior, Manjunath et al. (2002b) reforçam que o LDL interage com as principais proteínas do plasma dos mamíferos (BSPs) e essa interação parece ser crucial para a proteção espermática.

Embora não se conheça o exato mecanismo de proteção do leite contra o choque térmico, este efeito provavelmente está relacionado às proteínas de membrana. As proteínas do leite agem de modo similar às lipoproteínas da gema de ovo, ou seja, estabilizando as membranas espermáticas contra o efluxo de colesterol e fosfolipídios induzidos pelas BSPs enquanto mantém a viabilidade e integridade espermática durante o armazenamento (BERGERON et al., 2007; AMANN, GRAHAM, 2011). Se o sêmen não for diluído, as células são expostas continuamente a ação das BSPs (onipresente em todos os mamíferos) e o efluxo lipídico se mantém, resultando em menor resistência espermática aos processos de criopreservação (BERGERON et al., 2007). Enquanto a proteção pela gema de ovo envolve ligação entre proteínas BSPs com lipoproteínas de baixa densidade, são as micelas de caseína e proteínas presente no leite desnatado que protegem os espermatozoides da ação das BSP's pela ligação direta proteína:proteína, não havendo participação de lipídios/lipoproteínas, conforme a Figura 2 (MANJUNATH, 2012). No entanto, de acordo com Batellier et al. (2001), o leite é um fluido biológico com uma complexa composição na qual a caseína e algumas moléculas como a β -lactoglobulina são benéficas, enquanto outras, como a α -lactoalbumina, são prejudiciais à sobrevivência dos espermatozoides.

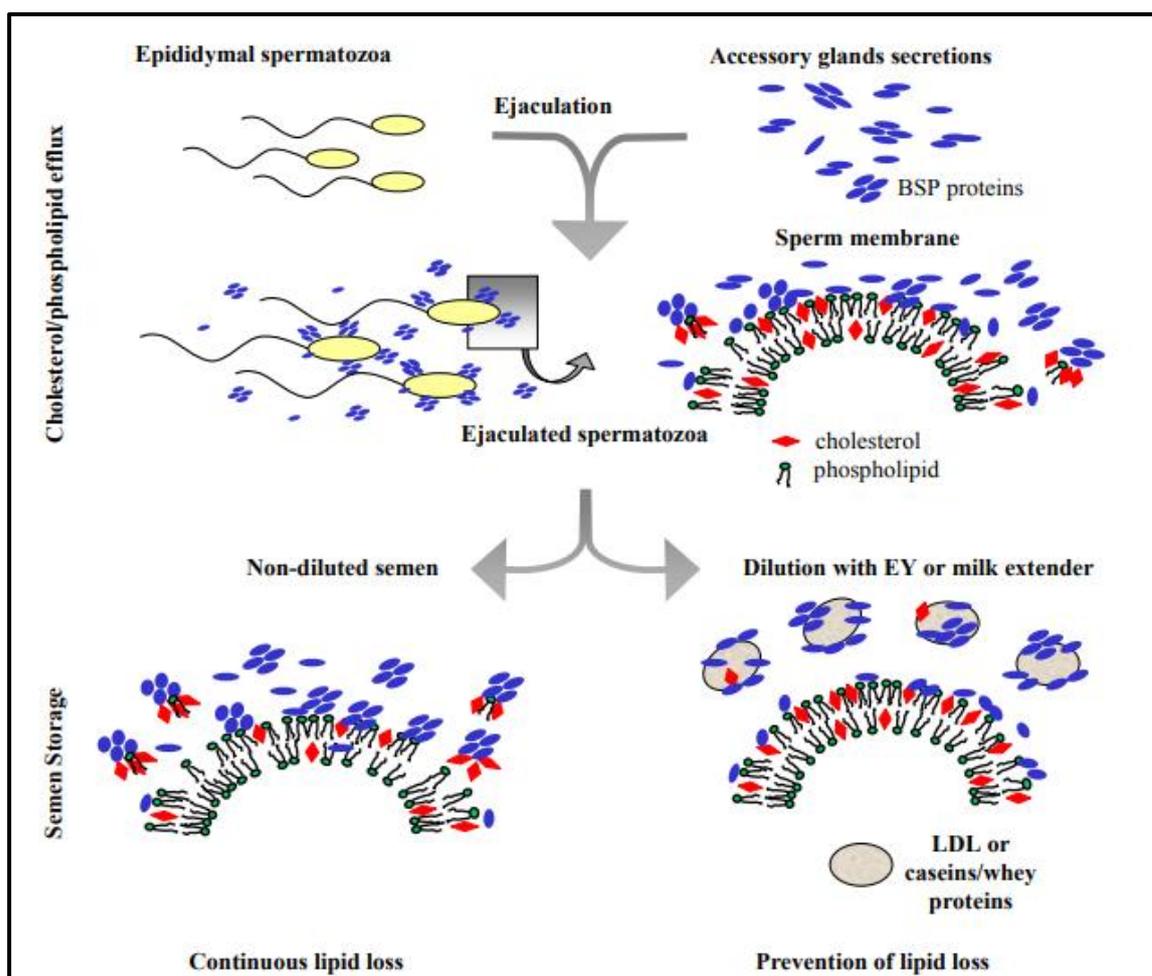


FIGURA 2. Mecanismo de proteção da gema de ovo e do leite desnatado (MANJUNATH, 2012).

Em busca de resultados mais homogêneos, algumas pesquisas vêm demonstrando a superioridade de novos diluentes cujas bases são frações específicas do leite, tais como as caseínas (MANJUNATH, 2012; CAMPOS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2018). Esses produtos previnem interações espermáticas indesejáveis com outras substâncias presentes no leite que podem diminuir a capacidade de fertilização e sobrevida dos espermatozoides e induzir a reação acrossomal (POMMER et al., 2002; AURICH, 2008). O uso de diluentes produzidos a base de caseínas permite que estas interajam com proteínas plasmáticas específicas, aumentando a viabilidade deste sêmen (MANJUNATH, 2012).

Neste sentido, diluentes compostos por caseína têm sido incorporados em pesquisas com sêmen equino refrigerado. Campos et al. (2020) demonstraram ser uma alternativa viável na substituição do leite desnatado em equinos, mantendo as

características e viabilidade espermáticas durante a refrigeração por 24 horas. O autor ainda valida o uso da caseína para garanhões “Bad Coolers”, pois mostrou-se mais eficiente à medida que elevaram as taxas de prenhez. Em asininos, Rodrigues et al. (2018) observaram que a retirada do plasma seminal e ressuspensão em meios diluentes à base de caseína ou gema de ovo mostraram-se eficientes na manutenção e longevidade espermática durante 24 horas de refrigeração a 5°C. Todavia, os resultados obtidos até o presente momento ainda são discretos sendo necessários mais estudos em asininos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se perceber que apesar de possuírem alto grau de parentesco, equinos e asininos apresentam diferenças quanto ao comportamento sexual, características reprodutivas, bem como a qualidade seminal frente às biotecnologias aplicadas ao sêmen. Em relação às bases diluidoras, alguns estudos vêm sendo realizados com o objetivo de esclarecer os efeitos do plasma seminal e a interação do sêmen asinino com os diluentes comerciais mais utilizados. Sugere-se que um estudo bioquímico e proteico detalhado dos componentes do plasma seminal asinino seria importante para caracterizar e isolar as substâncias envolvidas na proteção das células espermáticas durante o processo de criopreservação e manutenção da fertilidade.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Estrutura da membrana. In: ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: ArtMed Sul, 1999. p.354-378.
- ALGHAMDI, A.S.; FOSTER, D.N.; TROEDSSON, M.H.T. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 593-600, 2004.
- ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília/DF.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2 ed. Wiley-Blackwell, v.1, 2011. Cap. 102, p. 1053-1084.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- ARAÚJO, N.A. **Origem histórica do jumento doméstico: suas raças**. Patos de Minas: Ed. Grafipress, 1 ed, p. 311, 2010.
- ARAÚJO, E.A.B.; SILVA, L.F.M.C.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI, F.M.; ANDRADE Jr., L.R.P.; SOUZA, F.F.; DELL'AQUA Jr., J.A.; PAPA, F.O. Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 1, p.70-83, 2017.
- AURICH, J.E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, n. 5, p. 791-797, 1996.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 268-275, 2008.
- AVANZI, B.R.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA Jr, J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAUJO, G.H.M.; PAPA, F.O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 152-154, 2006.

- BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n 3-4, p.181-190, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 708-717, 2004.
- BERGERON, A.; MANJUNATH P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; BLONDIN, P.; MANJUNATH, P. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 1, p. 120-126, 2007.
- BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 863-873, 1999.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 129-136, 2000.
- BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, n. 4, p.249-264, 2007.
- BUSTAMANTE FILHO, I.C. **Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino**. 2006. 90f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n. 2, p.93-99, 2008.
- CAMPOS, G. A., GARCIA, V. C., FREITAS-DELL'AQUA, C. P., SEGABINAZZI, L.

- G. T. M., MACIEL, L. F. S., ALVARENGA, M. A., PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A. **Sodium caseinate and cholesterol improve Bad cooler stallion fertility**. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.93, p.1-5, 2020.
- CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; TORRES, C.A.A.; GUIMARÃES, J.D.; SOUZA, F.A.; SILVA, E.C.; MARTINS, L.F. Sexual behavior of jacks when an estrous mare is used in semen collection. **Animal Reproduction Science**, v. 3, n. 107, p. 314, 2008a.
- CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; SILVA, E.C.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A.L. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Ciência Agrária e Ambiental**, v.6, n.3, p.389-398, 2008b.
- CANISSO, I.F.; CARVALHO, G.R.; MOREL, M.D.; GUIMARÃES, J.D.; McDONELL, S.M. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 56-63, 2010.
- CANISSO, I.F.; MCDONNELL, S.M. Donkey breeding behavior with an emphasis on the Pêga breed. MATTHEWS NS & TAYLOR TS. **Veterinary Care of Donkeys**. Ithaca: International Veterinary Information Service, n. A2926, p. 0310, 2010.
- COTTORRELLA, A.P.; AMANCIO, R.C.; HENRY, M.; BORGES, I. Effect of storage temperature and extenders on in vitro activity of donkey spermatozoa. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 325-328, 2002.
- CROCKETT, E.L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**, v. 38, n. 2, p. 291-304, 1998.
- CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 1, p. 7-11, 1998.
- DALMAU, C.S. **Evaluación y conservación del sêmen en el asno Zamorano-leonés**. 2003. 190f. Tese (Doutorado) – Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid/ES.
- EL WISHY, A.B. Testicular and epididymal sperm reserves in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*). **Zeitschrift Fur Tierzucht Und Zuchtungsbiologie**, v.91, n. 1-4, p.334-344, 1974.
- FARRÁS, M.C.; AVANZI, B.R.; MELO, C.M.; DELL'AQUA Jr, J.A. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 693-699, 2008.

FERREIRA, M.F.L.; JONES, D.N.; HENRY, M.; GONÇALVES, A. Efeito da centrifugação e de diluentes sobre a preservação do sêmen resfriado de jumentos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte. **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - Anais científicos**, p.452, 1991.

FERREIRA, M.F.L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento**. 1993. 67f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolks and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, n. 2, p.277-284, 1977.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p.249-265, 2001.

GARCÍA, B.M., FERNÁNDEZ, L.G., FERRUSOLA, C.O., RODRÍGUEZ, A.M., BOLAÑOS, J.M.G., MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.811–818, 2011.

GASTAL, M.M.F.O. **Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos**. 1991. 105f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A.R.; GASTAL, E.L.; GONÇALVES, A. Sexual behavior of donkey jacks: influence of ejaculatory frequency and season. **Theriogenology**, v. 46, n. 4, p. 593-603, 1996.

GASTAL, M.O.; HENRY, M.; BEKER, A.R.; GASTAL, E.L. Effect of ejaculation frequency and season on donkey jack semen. **Theriogenology**, v. 47, n.3, p.627-638, 1997.

GIBB, Z.; AITKEN, R.J. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. **BioMedical Research**, Int. 8, 2016.

GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42-52, 1987.

GUASTI, P.N. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo**. 2010. 80f.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides eqüinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p.169-180, 2012.

HALL, J.C.; HADLEY, J.; DOMAN, T. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein and membrane physical state during epididymal maturation. **Journal of Andrology**, v. 12, n. 1, p. 76 – 87, 1991.

HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA Jr, J.A. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozóides na espécie equina: Uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p. 157-168, 2012.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA Jr, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 340-346, 2014.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p.753-759, 1995.

HENRY, M.; FIGUEIREDO, A.E.; PALHARES, M.S.; CORYN, M. Clinical and endocrine aspects of the oestrus cycle in donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 35, p.297-303, 1987.

HENRY, M.; McDONELL, S.M.; LODI, L.D.; GASTAL, E.L. Pasture mating behaviour of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.77-86, 1991.

HENRY, M.; LAGO, L.A.; MENDONÇA, L.F. Asininos: animais com características sociais e reprodutivas próprias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.223-230, 2009.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SACHALTENBRAND, V.I. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, n. 6, p. 1241-1252, 1992.

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

- KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 1, p.33-38, 2006.
- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v.107, n. 3-4, p.249-256, 2008.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PUCKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, n.4, p.601–614, 1992.
- KENNEY, R.M. Society for theriogenology manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings: **Society for Theriogenology**, 100p. 1983.
- KIRK, E.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 315–318, 2001.
- LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **Journal of Membrane Biology**, v. 165, n. 1, p. 1-10, 1998.
- LAUNAY, F. **Étude de la conservation de la semence de Baudet Du poitou**. 1990. 150f. Tese (Doutorado) - École Nationale, Vétérinaire de Nantes, France.
- LEEB, T.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E. Genetic markers for stallion fertility lessons from humans and mice. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 21-29, 2005.
- LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1584-1591, 2005.
- GARCÍA, B.M.; FERNÁNDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRIGUEZ, A.M.; MARTINEZ, H.R.; PENA, F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 141-148, 2011.
- MACHADO, M. S.; LEÃO, K. M.; GOMES, G. M.; MACEDO, L. P.; ALVARENGA, M. A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 194-196, 2002.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p.183-193, 2009.

- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-119, 2002a.
- MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002b.
- MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVRE, J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 217-228, 2007.
- MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809-15, 2012.
- MARTINUS, R.D.; MOLAN, P.C.; SHANNON, P. Deleterious effect of seminal plasma in the cryo-preservation of bovine spermatozoa. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 34, n. 3, p. 281-285, 1991.
- McDONNELL, S.M. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2-3, p. 277-282, 1998.
- MIRÓ, J.; LOBO, V.; QUINTERO-MORENO, A.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalonian donkey semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1706-1716, 2005.
- MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalonian donkey semen. **Theriogenology**, v.72, n.8, p.1017-1022, 2009.
- MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr, J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R.D.; GUAISTI, P.N. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 3-4, p. 197-201, 2011.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-2381, 2005. [https:// doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.032](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.032)
- MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; VIANA, W.G. Biologia reprodutiva de jumentos. II. Características físicas e morfológicas do sêmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, n. 1, p. 49-57, 1994a.

- MORAIS, R.N.; MUCCIOLO, R.G.; VIANA, W.G. Biologia reprodutiva de jumentos. III. pH, osmolalidade e níveis de eletrólitos no sêmen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 145-151, 1994b.
- MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.
- NOVAK, S.; SMITH, T.A.; PARADIS, F.; BURWASH, L.; DYCK, M.K.; FOXCROFT, G.R.; DIXON, W.T. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. **Theriogenology**, v. 74, n. 6, p. 956-967, 2010.
- 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 semen freezeability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 82-84, 2006.
- 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**. 2015. 84f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu/SP.
- PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2002.
- PAPA, F.O.; NEVES NETO, J.R.; FERREIRA, J.C.P.; ALVARENGA, M.A.; LEME, D.P. A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. In: **Annual Meeting of the Society for Theriogenology**, p. 149-151, 1998.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA Jr, J.A.; MACEDO, L.P.; CARVALHO, A.G.; ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS, A. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 19-27, 2005.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 293-301, 2008.
- PAPAS, M.; ARROYO, L.; BASSOLS, A.; CATALÁN, J.; BONILLA-CORREAL, S.; GACEM, S; MIRÓ, J. Activities of antioxidant seminal plasma enzymes (SOD, CAT, GPX and GSR) are higher in jackasses than in stallions and are correlated with sperm motility in jackasses. **Theriogenology**, v. 140, p. 180-187, 2019.

- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, n. 7, p.597-612, 2006.
- PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.97, p.55–74, 2015.
- POMMER, A.C.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1493-1501, 2002.
- PUGH, D. Donkey reproduction. **American Association of Equine Practitioners**, 2016.
- PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores**. 2009. 123f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.
- QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 403-407, 1980.
- RAPHAEL, C.F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES, L.T.; SOUSA, F.E.M.R.; CANUTO, L.E.F.; SILVA, L.F.M.C.; ANDRADE Jr, L.R.P.; OLIVEIRA, S. N.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA Jr, J.A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes e da remoção do plasma seminal na refrigeração do sêmen asinino (*Equus asinus*). **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 15, p. 143-144, 2018.
- RIGBY, S.L.; BRINSKO, S.P.; COCHRAN, M.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 171-180, 2001.
- ROSSI, R. **Comparação de dois diluidores na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen asinino a fresco ou resfriado**. 2008. 209f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG.
- ROTA, A.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiatia donkey spermatozoa. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 176-185, 2008.
- 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**, v. 78, n. 8, p. 1846–1854, 2012.

RUIZ-PESINI, E.; DíEZ-SÁNCHEZ, C.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J.; ENRIQUEZ, J.A. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? **Current topics in developmental biology**, v. 77, p. 3-19, 2007.

SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I.; GABRIEL, J.; GÓMEZ-CUÉTARA, C.; MATEOS, E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 329-332, 2002.

SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., FONSECA, F.A. Transporte e inseminação artificial com sêmen de equino. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da UFMG**, n.11, p. 3-112, 1994.

SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O.; PICKETT, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5°C or 20°C. In: **Proceedings of the 11^o International Congress in Animal Reproduction and Artificial Insemination**; Dublin: University College Dublin; 1988. p.297-299.

SQUIRES, E.L.; BRUBAKER, J.K.; McCUE, P.M.; PICKETT, B.W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 743-749, 1998.

TIBARY, A. Stallion reproductive behavior. In: SAMPER, J.C.; PICOCK J.F.; McKINNON, A.O. **Current therapy in equine reproduction**. WB Saunders. 2007. Cap. 28, p. 174-184.

TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives of histology and cytology**, v. 66, n. 5, p. 383-396, 2003.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 16-24, 2015.

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. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 1-2, p. 22-35, 2009.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P.; CURSON, B. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilising ability of bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 29, n. 3-4, p. 185-194, 1992.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membrane. In: Morris G.J.; Clark, A. **Effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press; p. 189-218, 1981.

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

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR, J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v. 58, p. 237-240, 2002.

HIPÓTESE

O processamento do sêmen asinino com diluente a base de caseína pode substituir o uso de diluentes a base de leite ou gema de ovo na refrigeração de sêmen asinino a 5°C, com ou sem plasma seminal, proporcionando resultados superiores de cinética e integridade espermática, bem como na taxa de fertilidade.

OBJETIVOS

- Comparar a eficiência de meios diluentes a base de caseína, gema de ovo e leite desnatado na manutenção de cinética e viabilidade espermática do sêmen refrigerado de asininos.
- Observar os efeitos do plasma seminal sobre os parâmetros de cinética e integridade espermática do sêmen asinino refrigerado a 5°C por 24 e 48 horas e se há interferência nas taxas de fertilidade em éguas.
- Determinar a taxa de fertilidade do sêmen asinino diluído em meios a base de caseína, leite desnatado e gema de ovo e refrigerado a 5°C por 24 horas, avaliando-se a taxa de prenhez em éguas.



CAPÍTULO 2

1 Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A1
2 pelo QUALIS – CAPES 2019.

3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

4
5 **Efeito de diluentes a base de leite desnatado, caseína e gema de ovo sobre as características**
6 **espermáticas e fertilidade do sêmen refrigerado de jumento Pêga com ou sem plasma**
7 **seminal**

8 M.L.M. Gobato^{*1}, L.G.T. Segabinazzi¹, V.F.C. Scheeren¹, R.S. Bandeira¹, T.M.S. Cavalero¹,
9 L.E.F. Canuto¹, L.T. Rodrigues¹, S.N. Oliveira¹, C.P. Freitas-Dell'Aqua¹, J.A. Dell'Aqua Jr¹,
10 F.O. Papa¹

11
12 ¹Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ, Universidade Estadual
13 Paulista, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil

14 *Autor para correspondência Tel.: +55 14 998143303

15 E-mail: mariana_gobato@hotmail.com

16

17 **RESUMO**

18 Os objetivos do presente estudo foram comparar os efeitos de três diferentes bases diluentes sobre
19 a qualidade espermática e fertilidade *in vivo* do sêmen asinino refrigerado, com ou sem plasma
20 seminal. Dois ejaculados de jumentos (n=6) da raça Pêga, entre 4 e 12 anos foram utilizados. Cada
21 ejaculado foi dividido em 6 tratamentos: leite (BotuSêmen Special[®]), caseína (BotuSêmen Gold[®])
22 e gema de ovo (BotuCrio[®]) com plasma seminal, na concentração de 50 milhões de
23 espermatozoides/mL e sem plasma seminal, após centrifugação e ressuspensão a 100 milhões de
24 espermatozoides/mL. As amostras foram avaliadas a fresco (T0), 24 (T24) e 48 (T48) horas pós-
25 refrigeração. Os parâmetros avaliados foram: cinética espermática pelo método computadorizado
26 CASA, desestabilização da membrana espermática, produção de espécies reativas ao oxigênio e

27 atividade mitocondrial por citometria de fluxo. O teste de fertilidade foi realizado com éguas
28 (n=15; 6 ciclos) em sistema *crossover*, inseminadas com um jumento de fertilidade comprovada e
29 a gestação identificada por ultrassonografia aos 15 dias. O diluente à base de leite apresentou
30 resultados inferiores para motilidade total (MT), progressiva (MP) e rápidos (RAP) sem plasma
31 seminal em todos os momentos avaliados e maior produção de ânion superóxido em T48, na
32 presença do plasma seminal ($P<0,05$). Já o meio à base de caseína sem plasma seminal, apresentou
33 resultados superiores para todos os parâmetros avaliados em todos os momentos ($P<0,05$), com
34 exceção dos valores de desestabilização de membrana em T24 que não apresentou diferença
35 significativa. Os resultados com meio à base de gema de ovo não sofreram efeito do plasma
36 seminal e também mostraram-se superiores, com exceção de MP e RAP em T48 ($P<0,05$). A
37 caseína e a gema de ovo apresentaram elevada taxa de fertilidade tanto com (73% vs 93%) quanto
38 sem plasma seminal (93% vs 73%), respectivamente. Já o leite desnatado apresentou valores
39 similares sem plasma seminal (60%), porém diferiu estatisticamente na presença de plasma (20%).
40 Conclui-se que apesar de demonstrar resultados satisfatórios na refrigeração do sêmen equino, o
41 leite desnatado apresenta pior interação com o sêmen asinino refrigerado. Já a gema de ovo e a
42 caseína, demonstraram ser as melhores alternativas para a refrigeração de sêmen asinino por até
43 48 horas.

44 **Palavras-chave:** asinino; refrigeração; caseína; leite desnatado; gema de ovo.

45

46 1. Introdução

47 A refrigeração de sêmen equino é uma biotécnica difundida mundialmente pois além de
48 segura e econômica, evita riscos associados com o transporte de animais e com a monta natural -
49 sendo o Brasil e Estados Unidos os países que mais realizam IA com sêmen refrigerado
50 transportado no mundo [1]. Devido a ampla aceitação por várias associações de criadores e a

51 facilidade de manejo agregada a refrigeração do sêmen, tem-se difundido o uso desta biotécnica
52 também para a espécie asinina; porém os resultados ainda são escassos.

53 O armazenamento de sêmen refrigerado em baixa temperatura prolonga a viabilidade
54 espermática pois reduz o consumo de energia e a formação de subprodutos [2]. Durante o processo
55 de refrigeração, a cada 10°C de queda na temperatura, o metabolismo espermático é reduzido em
56 cerca de 50%, ou seja, na temperatura final de 5°C apenas 10% de seu metabolismo é necessário
57 para sobrevivência, crucial para garantir a viabilidade das células espermáticas durante o
58 armazenamento e transporte [3].

59 Busca-se manter o potencial fertilizante do sêmen, porém longos períodos de
60 armazenamento podem desencadear processos bioquímicos que comprometem a fertilidade do
61 sêmen, como a capacitação precoce, instabilidade nuclear, perda de componentes intracelulares e
62 peroxidação lipídica das membranas espermáticas [4].

63 Apesar da ampla difusão, as taxas de fertilidade com sêmen refrigerado são muito variáveis
64 e dentre os fatores mais relevantes, incluem: a variação individual do reprodutor, visto a
65 sensibilidade que alguns ejaculados apresentam ao processo de refrigeração; a presença e
66 composição do plasma seminal e a composição do meio diluente utilizado [5,6].

67 A influência da composição do plasma seminal sobre ejaculados refrigerados ainda é
68 contraditória, sendo notado um efeito benéfico na adição de plasma seminal de garanhões com alta
69 motilidade ao ejaculado de garanhões com baixa motilidade [7], porém até o presente momento
70 estudos neste sentido não foram conduzidos para a espécie asinina. No entanto, trabalhos
71 demonstraram que a remoção do plasma seminal mostrou-se eficiente na manutenção da
72 longevidade e viabilidade espermática durante a refrigeração em asininos [8,9].

73 Especificamente no processo de refrigeração em mamíferos, a característica mais importante
74 de um bom diluente é a sua capacidade de estabilizar as membranas durante a fase de transição,
75 momento crítico no qual ocorrem a maioria das lesões espermáticas [10]. Neste sentido, os

76 diluentes são constituídos por leite e/ou gema de ovo e suas proteínas agem de modo similar no
77 processo de estabilização das membranas espermáticas, garantindo proteção contra o efluxo de
78 colesterol e fosfolipídios de membrana provocados pelas proteínas BSP (*Binder of Sperm*
79 *Proteins*) do plasma seminal [11,12]. A gema de ovo possui lipoproteínas de baixa densidade
80 (LDL) que se ligam às BSP's [13-16], mantendo a membrana espermática estável. Ademais, o
81 LDL contribui para que as espécies reativas de oxigênio (ERO's) produzidos sejam degradados
82 pois funciona como um potente antioxidante com ação crioprotetora extracelular, reduzindo lesões
83 de membrana, minimizando os efeitos da peroxidação lipídica e mantendo a motilidade e
84 viabilidade celular durante armazenamento [12,14,16,17].

85 Em busca de resultados mais homogêneos, diluentes cujas bases são frações específicas do
86 leite, tais como as caseínas, têm sido incorporados demonstrando ser uma alternativa viável na
87 substituição do leite desnatado, mantendo as características e viabilidade espermáticas durante a
88 refrigeração por 24 horas [9,13]. O uso de diluentes produzidos a base de caseínas permite que
89 estas interajam com proteínas plasmáticas específicas aumentando a viabilidade do sêmen [12],
90 além de impedir interações espermáticas indesejáveis com outras substâncias presentes no leite
91 que podem diminuir a capacidade de fertilização e sobrevivência dos espermatozoides [4,18].

92 O avanço na preservação do sêmen equino refrigerado tem sido direcionado para a
93 composição das bases diluentes, assim como para a interferência do plasma seminal durante o
94 processamento. Partindo do princípio que equinos e asininos pertencem à espécies diferentes e
95 portanto têm mecanismos próprios para manter a integridade da membrana, prevenir o estresse
96 oxidativo e preservar a motilidade espermática durante a refrigeração, o objetivo deste estudo foi
97 comparar o efeito de três diferentes bases diluentes sobre a qualidade espermática e fertilidade in
98 vivo do sêmen asinino refrigerado a 5°C, com ou sem plasma seminal.

99

100

101 **2. Materiais e métodos**

102 Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade
103 de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ – Unesp –
104 Botucatu/SP), sob Protocolo nº 0126/2019.

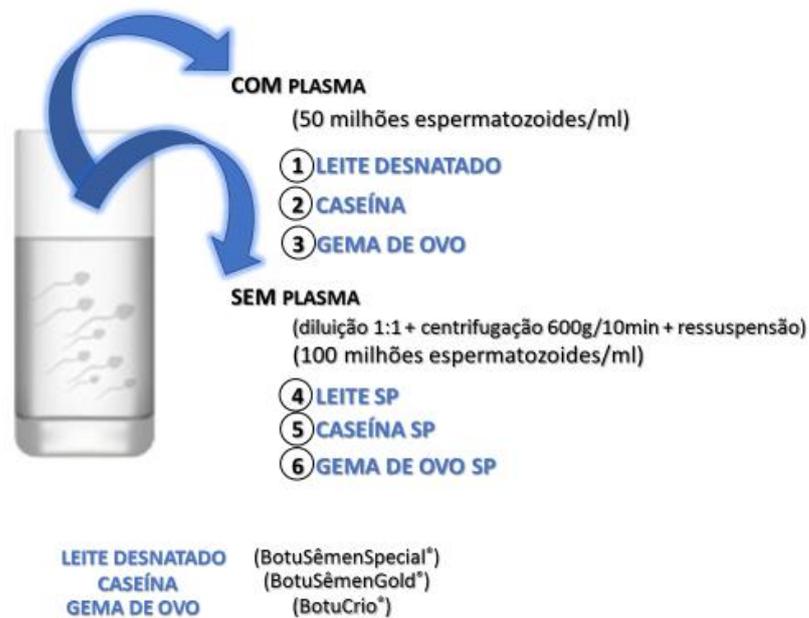
105

106 *2.1 Animais, processamento e análise do sêmen*

107 Foram utilizados 2 ejaculados de 6 jumentos da raça Pêga com idade entre 4 e 12 anos,
108 considerados aptos perante exame andrológico completo e fertilidade comprovada. Os animais
109 pertenciam a um criatório particular, localizado no município de Laranjal Paulista/SP
110 (23°04'53.4"S 47°53'21.3"W). Para o teste de fertilidade foi selecionado um dos jumentos e 15
111 éguas, pertencentes ao CERBEC-Posto de Monta da Fazenda Lageado, Unesp – Botucatu foram
112 utilizadas.

113 Os ejaculados foram colhidos em vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, SP,
114 Brasil) e, imediatamente após a colheita, o sêmen foi filtrado para retirada da fração gel e
115 realizadas as avaliações macroscópicas de volume, coloração, aspecto e odor. A concentração
116 espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) foi determinada pela câmara hematimétrica de Neubauer
117 (Optik Labor, Lancing, Inglaterra), sob microscopia de contraste de fase (Jenamed 2 Zeiss: Carls
118 Zeiss, Munique, Alemanha) em aumento de 200x.

119 O processamento das amostras foi feito de acordo com o delineamento experimental descrito
120 na Figura 1.



121
122 FIGURA 1. Delineamento experimental do processamento das amostras. Cada ejaculado foi
123 dividido em seis grupos diluídos em meios comerciais a base de leite desnatado (BotuSêmen
124 Special®, Botupharma, SP, Brasil), caseína (BotuSêmen Gold®, Botupharma, SP, Brasil) e gema
125 de ovo (Botu Crio®, Botupharma, SP, Brasil). As amostras *com plasma* foram diluídas a 50
126 milhões de espermatozoides/ml e formados os grupos 1, 2 e 3. Já as amostras *sem plasma* foram
127 diluídas em 1:1 (v/v), centrifugadas a 600g/10min e ressuspensas a 100 milhões de
128 espermatozoides/ml, respeitando a concentração recomendada pelo fabricante, formando os
129 grupos 4, 5 e 6.

130
131 Após manipulação, uma alíquota de cada grupo foi analisada em laboratório conforme
132 delineamento preconizado (T0). Estabelecendo a concentração total de 500×10^6
133 espermatozoides/tubo, as amostras foram acondicionadas em Botu-flex® (Botupharma, Botucatu-
134 SP, Brasil) a 5°C para posterior avaliação em 24 (T24) e 48 (T48) horas de refrigeração. As caixas
135 permaneciam lacradas até o momento das avaliações nos tempos descritos.

136 As análises do sêmen e preparação das amostras foram realizadas no Centro de
137 Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal (CERAN), pertencente ao Departamento de
138 Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
139 (FMVZ) Unesp – Botucatu/SP – Brasil.

140 2.1.1 *Cinética espermática*

141 A cinética espermática foi avaliada pelo método computadorizado – CASA (HTM-IVOS 12,
142 Hamilton Thorne Research, MA, EUA), de acordo com as configurações descritas por Carneiro et
143 al. [19]. Foram avaliados 5 campos aleatórios para determinação dos parâmetros: motilidade total
144 (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), e espermatozoides rápidos (RAP; %) em T0, 24 e 48
145 horas de refrigeração.

146

147 2.1.2 *Morfologia Espermática*

148 Para avaliação da morfologia espermática o sêmen foi diluído em solução de formol salina
149 a 10%. A preparação úmida foi avaliada em microscopia de contraste de interferência diferencial
150 de fase (DIC – Leica DM 2500: Leica Microsystems, SP, Brasil), em um aumento de 1000x.

151 Foram analisadas 100 células para características morfológicas de cabeça, peça intermediária
152 e cauda, resultando no percentual de defeitos conforme previamente descrito por Blom [20].

153

154 2.1.3 *Citometria de fluxo*

155 Para as análises de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento LSR Fortessa (Becton
156 Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW, vermelho
157 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados foram avaliados por
158 programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v 6.1.

159 Para todos os ensaios as amostras foram diluídas em TALP-PVA modificado segundo
160 Parrish et al. [21] (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM
161 DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM HEPES-livre de ácido, 1,0mM
162 piruvato de sódio, 1,0mg/ml álcool polivinil-PVA e 25µg/ml gentamicina) na concentração de
163 5×10^6 espermatozoides/ml, acrescido de Hoescht 33342 (7µM) para exclusão das partículas não
164 celulares.

165 Autofluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste de
166 sobreposição de onda e compensação utilizando-se a matriz de compensação do próprio software.
167 Os dados foram gerados utilizando-se gráficos dotplot incluindo eixo t (bi-exponencial)
168 tornando todos os eventos visíveis e propriamente compensados. No mínimo 10.000 células por
169 amostra foram analisadas.

170 Para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular foi utilizado
171 $2\mu M$ dihydrorhodamine 123 (D23806 – Life Technologies). Neste ensaio associou-se $1.5\mu M$ de
172 iodeto de propídio (diluído em TALP-PVA) e $1\mu M$ de dihydrorhodamine 123 (diluído em DMSO),
173 a incubação foi realizada por 20min a $37^\circ C$ ao abrigo da luz.

174 Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática, potencial mitocondrial e da
175 geração de superóxido (O_2^-) intracelular foi utilizada a associação de 25nM Yo-Pro[®] (Y3603 –
176 Life Technologies; marcação para célula com membrana plasmática lesada), $20\mu M$ MitoStatusRed
177 (564697- BD Pharmigen; potencial mitocondrial) e $2\mu M$ de Dihidroethidium (D23107 – Life
178 Technologies; geração de ânion superóxido intracitoplasmático), e a amostra incubada por 20min
179 a $37^\circ C$ para posterior leitura no Citômetro de fluxo.

180

181 *2.2 Teste de Fertilidade*

182 O teste de fertilidade foi realizado de setembro de 2019 a abril de 2020. Foram utilizados 6
183 ciclos de 15 éguas, entre 5 e 15 anos, com histórico reprodutivo comprovado. Foi adotado o sistema
184 *crossover*, no qual cada égua é inseminada 6 vezes ao longo da estação reprodutiva, onde cada
185 inseminação representa 1 grupo. As éguas foram monitoradas diariamente por ultrassonografia
186 transretal modo B (transdutor linear, frequência de 5 MHz, SonoScape A6[®], Medical Corp, China)
187 e quando o maior folículo atingiu tamanho $\geq 35mm$ de diâmetro, sinais de estro e edema uterino
188 3, a ovulação foi induzida com um análogo de GnRH, acetato de histrelina, I.M. ($250\mu g/ml$
189 Strelin[®], Botupharma, Botucatu, SP, Brasil).

190 Respeitou-se a dose inseminante de 1×10^9 de espermatozoides móveis e as inseminações
191 ocorreram 24 horas após a indução da ovulação com sêmen asinino refrigerado a 5°C por 24 horas,
192 depositado no corpo do útero. Quinze dias após a inseminação foi efetuado o diagnóstico de
193 gestação através de exame ultrassonográfico.

194

195 *2.3 Análise estatística*

196 As variáveis do sêmen foram avaliadas pelo programa GraphPad Prisma (GraphPad
197 Software Inc, USA). A normalidade dos dados foi testada utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov.
198 Dados paramétricos foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de
199 Tukey. Para dados não paramétricos foi utilizado Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Para
200 a fertilidade, foi utilizado o teste exato de Fisher e diferenças significativas foram consideradas
201 quando $P < 0,05$.

202

203 **3. Resultados**

204 Os meios à base de caseína e gema de ovo nos grupos sem plasma seminal apresentaram
205 cinética superior em relação ao meio à base de leite em todos os momentos avaliados. Apenas a
206 MT no momento T0 do meio à base de gema de ovo não apresentou diferença estatística quando
207 comparado ao meio à base de leite (Tabela 1).

208 Nos grupos com plasma seminal os diferentes meios apresentaram cinética espermática
209 similar em T0, enquanto em T24 o meio à base de gema de ovo mostrou-se significativamente
210 superior aos demais. No momento T48 o parâmetro MT do grupo a base de gema de ovo foi
211 superior ao grupo a base de leite e semelhante ao grupo com caseína. A MP foi semelhante entre
212 os grupos, porém a porcentagem de RAP foi estatisticamente maior no grupo caseína em relação
213 ao leite e semelhante ao grupo a base de gema de ovo (Tabelas 2 e 3).

214

TABELA 1. Média \pm erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, avaliados por método computadorizado CASA no momento T0 (T0). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.

T0	LEITE		CASEÍNA		GEMA	
	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
MT	91.1 \pm 1.3 ^{ab}	82.9 \pm 3.3 ^b	92.5 \pm 0.9 ^a	93.1 \pm 1 ^a	93.4 \pm 0.4 ^a	91.7 \pm 0.6 ^{ab}
MP	57.5 \pm 1.8 ^b	51 \pm 2.6 ^b	57.3 \pm 1.8 ^b	63.8 \pm 1.6 ^a	60.9 \pm 1.7 ^{ab}	65.1 \pm 2 ^a
RAP	86.6 \pm 1.5 ^{ab}	74.7 \pm 3.9 ^b	89.4 \pm 1.1 ^a	90.3 \pm 1.1 ^a	89 \pm 1 ^a	88.4 \pm 0.6 ^a

215 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).
 216 T0: momento até 4 horas após colheita; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva;
 217 RAP: espermatozoides com movimento rápido.

218
 219 TABELA 2. Média \pm erro padrão dos parâmetros de cinética espermática, após 24 horas de
 220 refrigeração (T24). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.

T24	LEITE		CASEÍNA		GEMA	
	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
MT	80.5 \pm 2 ^b	65.5 \pm 3.5 ^b	75.3 \pm 3.2 ^b	89 \pm 1 ^a	89.9 \pm 1.1 ^a	89.3 \pm 1.1 ^a
MP	45.8 \pm 1.4 ^{bc}	23.4 \pm 2.5 ^c	40.1 \pm 3.7 ^{bc}	53.8 \pm 1.6 ^{ab}	58.5 \pm 1.9 ^a	49.4 \pm 1.8 ^{ab}
RAP	69.7 \pm 2.3 ^b	44.5 \pm 4 ^c	67.6 \pm 3.8 ^{bc}	84.3 \pm 1.3 ^a	84.5 \pm 1.7 ^a	85.7 \pm 1.7 ^a

221 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b, c) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).
 222 T24: momento 24 horas após refrigeração; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva;
 223 RAP: espermatozoides com movimento rápido.

224
 225 TABELA 3. Média \pm erro padrão dos parâmetros de cinética espermática após 48 horas de
 226 refrigeração (T48). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.

T48	LEITE		CASEÍNA		GEMA	
	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
MT	39.9 \pm 6.3 ^b	35.7 \pm 4.6 ^b	66 \pm 3.6 ^{ab}	82.2 \pm 1.7 ^a	73.4 \pm 3.3 ^a	78.4 \pm 4.4 ^a
MP	20.2 \pm 3.7 ^{bc}	9.6 \pm 1.7 ^c	33.7 \pm 3.7 ^b	46.8 \pm 2.6 ^a	29.4 \pm 4.7 ^b	29.4 \pm 3 ^b
RAP	29.6 \pm 6.2 ^{cd}	20.2 \pm 3.4 ^d	54.1 \pm 4.1 ^b	72.8 \pm 2.1 ^a	48.9 \pm 6.7 ^{bc}	56.6 \pm 6 ^{ab}

227 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b, c, d) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).
 228 T48: momento 48 horas após refrigeração; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva;
 229 RAP: espermatozoides com movimento rápido.

230 De um modo geral, os valores de membrana plasmática estável foram superiores nos grupos a
 231 base de gema de ovo (com e sem plasma seminal) após 24 e 48 horas de refrigeração.

Os níveis de ERO's nos grupos com plasma seminal foram semelhantes no momento T0, no entanto, em T24 o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas amostras do meio a base de gema de ovo foi maior em relação ao grupo a base de caseína, e semelhante ao grupo a base de leite. Em T48, a gema de ovo também apresentou valores mais altos, diferindo do grupo a base de caseína e leite, com valores significativamente inferiores para o último. Contrariamente, o superóxido (O₂⁻) foi significativamente inferior nas amostras com meio a base de gema de ovo em T24 e no momento T48 os grupos a base de gema de ovo e caseína obtiveram níveis inferiores em relação ao grupo a base de leite (P>0.05).

O potencial de membrana mitocondrial de um modo geral foi maior nos grupos contendo meio a base de gema de ovo, com ou sem plasma, e semelhante aos grupos caseína e leite sem plasma seminal em todos os momentos, com exceção para o grupo caseína com plasma em T0 que também apresentou valores similares (Tabela 4).

TABELA 4. Média ± erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana, produção de H₂O₂ e O₂⁻ intracelular e potencial mitocondrial em T0. Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.

T0	LEITE		CASEÍNA		GEMA	
	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
MPE	50.9±7 ^{ab}	57.2±4.6 ^{ab}	52.2±3.6 ^{ab}	48.4±5.7 ^b	70.6±4 ^a	62.6±4 ^{ab}
H ₂ O ₂	72.6±2.5	78.2±2.8	72.1±3.3	72.8±4.4	82.3±2.4	79.3±2.6
HPM	45.7±6.6 ^b	51.6±5 ^{ab}	48.5±4.3 ^{ab}	47±6 ^{ab}	67.8±3.6 ^a	63.3±4 ^{ab}
O ₂ ⁻	43.9±6.6	37.1±4.7	42.5±3.6	42.3±6.4	28.7±3.5	34.1±4.4

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente (p< 0,05).
 PC: momento até 4 horas após colheita; MPE: membrana plasmática estável; %H₂O₂: concentração total de H₂O₂;
 %O₂⁻: concentração total de O₂⁻; %HPM: potencial mitocondrial total.

De acordo com as características relacionadas à integridade e funcionalidade espermática, o grupo caseína apresentou efeito negativo na presença do plasma seminal para todos os

251 parâmetros avaliados em T24 e T48. Também houve efeito negativo da presença do plasma
 252 seminal no grupo a base de leite desnatado, evidente em T48 (Tabelas 5 e 6).

TABELA 5. Média \pm erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana, produção de H_2O_2 e O_2^- intracelular e potencial mitocondrial, após 24 horas de refrigeração (T24). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.

T24	LEITE		CASEÍNA		GEMA	
	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
MPE	59.1 \pm 3.2 ^b	66.8 \pm 3.7 ^{ab}	44.1 \pm 3.1 ^c	59.6 \pm 2.9 ^b	76.1 \pm 3.2 ^a	75.1 \pm 2.9 ^a
H ₂ O ₂	72.2 \pm 2.7 ^{bc}	86.4 \pm 2 ^a	68.8 \pm 5.6 ^c	86.3 \pm 2 ^a	82.9 \pm 3.8 ^{ab}	79.2 \pm 2.4 ^{abc}
HPM	50.9 \pm 4.5 ^{bc}	65 \pm 3.8 ^{ab}	44.7 \pm 3.3 ^c	62.2 \pm 2.8 ^{ab}	74.3 \pm 3 ^a	75.5 \pm 2.9 ^a
O ₂ ⁻	41.8 \pm 4.5 ^b	31.9 \pm 2.7 ^{ab}	55.9 \pm 3.7 ^c	36.5 \pm 3.2 ^{ab}	28.2 \pm 2.7 ^a	26.6 \pm 2.4 ^a

253 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b, c) na mesma linha diferem significativamente (p < 0,05).
 254 T24: momento 24 horas após refrigeração; MPE: membrana plasmática estável; %H₂O₂: concentração total de H₂O₂;
 255 %O₂⁻: concentração total de O₂⁻; %HPM: potencial mitocondrial total.
 256

TABELA 6. Média \pm erro padrão dos parâmetros de integridade de membrana, produção de H_2O_2 e O_2^- intracelular e potencial mitocondrial, após 48 horas de refrigeração (T48). Diluentes a base de leite, caseína e gema de ovo, com e sem plasma seminal.

T48	LEITE		CASEÍNA		GEMA	
	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
MPE	30.1 \pm 4.5 ^c	56.9 \pm 3.4 ^b	41.6 \pm 2.6 ^c	64.1 \pm 3.4 ^{ab}	75 \pm 3.4 ^a	75.3 \pm 2.6 ^a
H ₂ O ₂	33.1 \pm 4.3 ^c	72 \pm 3.7 ^a	51 \pm 5.6 ^b	82 \pm 2.8 ^a	82.1 \pm 2.8 ^a	82 \pm 1.7 ^a
HPM	24.8 \pm 4.4 ^c	54.1 \pm 3.2 ^{ab}	39.3 \pm 3.2 ^{bc}	66.1 \pm 3.3 ^a	54.1 \pm 8.6 ^{ab}	66.8 \pm 4.2 ^a
O ₂ ⁻	69 \pm 4.5 ^c	48.2 \pm 4.4 ^{ab}	57 \pm 2.3 ^{bc}	30.9 \pm 3 ^a	39.8 \pm 6.6 ^{ab}	35.2 \pm 4.6 ^a

257 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b, c) na mesma linha diferem significativamente (p < 0,05).
 258 T48: momento 48 horas após refrigeração; MPE: membrana plasmática estável; %H₂O₂: concentração total de H₂O₂;
 259 %O₂⁻: concentração total de O₂⁻; HPM: potencial mitocondrial total.
 260

261 A porcentagem total de defeitos espermáticos não ultrapassou 15%.

262 Em relação ao teste de fertilidade, os grupos com meio a base de leite apresentaram resultados
 263 inferiores e foram, estatisticamente, piores na presença do plasma seminal (20% de fertilidade)
 264 quando comparados aos grupos com meios a base de caseína e gema de ovo, os quais mantiveram

265 as taxas de fertilidade em torno de 73 a 93%. No entanto, o grupo a base de leite na ausência de
 266 plasma seminal não diferiu dos demais, com taxa de fertilidade em torno de 60% (Tabela 7).

267
 268 Tabela 7. Taxa de Fertilidade do sêmen asinino diluído em leite desnatado, caseína e gema de ovo,
 269 com e sem plasma seminal e refrigerado por 24 horas.

LEITE		CASEÍNA		GEMA	
COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA	COM PLASMA	SEM PLASMA
20% ^b	60% ^{ab}	73% ^a	93% ^a	93% ^a	73% ^a
(3/15)	(9/15)	(11/15)	(14/15)	(14/15)	(11/15)

270 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b, c) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).

271

272 4. Discussão

273 Apesar de bem estabelecida a eficiência de diluentes a base de leite para a refrigeração de
 274 sêmen equino, devido a sua complexa composição, tem-se estudado frações específicas do leite,
 275 tais como as caseínas [12,13]. No entanto, no presente estudo, o grupo diluído em leite desnatado
 276 demonstrou resultados inferiores de integridade e cinética espermática independente da remoção
 277 ou não do plasma seminal. Desta forma, supõe-se que os componentes do leite desnatado podem
 278 ter sido insuficientes ou ter exercido ação prejudicial aos espermatozoides de asininos, contrário
 279 ao comportamento observado em ejaculado de equinos submetido ao processo de refrigeração
 280 utilizando-se o mesmo diluente [22].

281 Imediatamente após a colheita (T0), resultados superiores de MT e RAP foram observados nos
 282 grupos caseína e gema de ovo tanto na presença como na ausência do plasma seminal, supondo
 283 não haver efeito deste no processamento das amostras neste momento. No entanto, em T24, notou-
 284 se efeito negativo da presença do plasma seminal utilizando-se caseína, sugerindo que há uma
 285 maior biodisponibilidade dos constituintes do meio quando o plasma seminal é removido,
 286 fornecendo proteção aos espermatozoides quando submetidos a 24 horas de refrigeração.
 287 Provavelmente, por se tratar de um meio mais completo e enriquecido, este efeito não tenha sido

288 evidente no grupo a base de gema de ovo, que manteve resultados consistentes em T24.
289 Similarmente, Pagl et al. [23] observaram que a centrifugação associada a meios proteicos
290 específicos a base de caseína aumentou a porcentagem de espermatozoides móveis e íntegros em
291 equinos.

292 Os resultados apresentados sugerem que as lipoproteínas presentes na gema de ovo são mais
293 eficientes em relação às micelas de caseína contra a ação das BSPs presentes no plasma seminal
294 de asininos, já que o grupo com meio a base de gema de ovo não apresentou ação deletéria
295 significativa do plasma seminal.

296 Similarmente, os grupos a base de gema de ovo e caseína após a refrigeração, tanto em T24
297 quanto em T48, além de apresentarem maior cinética e integridade de membrana plasmática,
298 também apresentaram valores mais elevados de potencial de membrana mitocondrial e,
299 conseqüentemente, maiores níveis de H_2O_2 . A mensuração do potencial mitocondrial indica a
300 capacidade do espermatozoide em produzir ATP e está positivamente correlacionado com a
301 manutenção do metabolismo, parâmetros de cinética e sobrevivência espermática [24]. A maioria
302 do oxigênio consumido é utilizado pela mitocôndria durante a fosforilação oxidativa e uma
303 pequena parcela, utilizada pelos espermatozoides para a produção controlada de EROS de forma
304 endógena, essencial para a desestabilização da membrana espermática antes dos processos de
305 capacitação e reação acrossomal [25]. Contudo, uma elevada produção de ERO's pode reduzir o
306 potencial mitocondrial através da alteração da síntese de ATP, homeostase do Cálcio e transporte
307 de metabólitos [26]. Ortega-Ferrusola et al. [27] observaram que a alta produção de ERO's causou
308 estresse oxidativo e afetou negativamente a integridade de membrana plasmática além de elevar a
309 expressão de marcadores de apoptose nos espermatozoides.

310 Embora o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) seja uma molécula quimicamente estável e, portanto,
311 não é considerado um radical livre, ele participa da reação de Haber-Weiss que dará origem ao
312 radical hidroxila (OH); altamente reativo e precursor do processo de peroxidação lipídica. Os

313 autores sugerem que o H_2O_2 é simplesmente subproduto de alta atividade mitocondrial e está
314 presente em maior concentração no plasma de garanhões com boa qualidade seminal, portanto
315 acredita-se que haja correlação positiva com o metabolismo normal dos espermatozoides e taxa de
316 fertilidade em garanhões [28]. No presente estudo, o H_2O_2 apresentou concentrações superiores
317 nos grupos diluídos com gema de ovo e caseína e os níveis de O_2^- apresentaram-se
318 significativamente reduzidos, sugerindo que ambos promoveram uma maior proteção a atividade
319 metabólica em relação aos grupos diluídos em meio a base de leite.

320 O ânion superóxido (O_2^-) é precursor para a maioria das ERO's, com alta capacidade de causar
321 peroxidação lipídica e consequente desestabilização da membrana plasmática dos
322 espermatozoides. Na reação de Haber-Weiss, este radical livre reage com H_2O_2 e formam o radical
323 hidroxila, considerado um dos agentes oxidantes mais potentes, capaz de desestabilizar a
324 membrana espermática e reagir com lipídeos insaturados presentes nas membranas e DNA celular
325 [19]. Desse modo, é provável que a concentração elevada de O_2^- nos grupos diluídos com meio a
326 base de leite tenham ocasionado uma maior peroxidação lipídica devido a uma ineficiência no
327 controle da produção de ERO's e de O_2^- , permitindo que lesões prematuras de membrana
328 ocorressem [29-31]. Do mesmo modo, as amostras diluídas em meio a base de leite exibiram uma
329 maior proporção de células desestabilizadas e baixo potencial mitocondrial, sugerindo que esteja
330 ocorrendo maior criocapacitação durante o armazenamento [29].

331 Como o leite apresenta composição complexa, formado por mais de 100.000 moléculas, sendo
332 que algumas proteínas são prejudiciais à viabilidade espermática [5], esperava-se que os grupos
333 diluídos em caseína obtivessem maior viabilidade em relação aos grupos diluídos em meio a base
334 de leite. Além disso, estudos demonstraram a associação das micelas de caseína com as proteínas
335 BSPs dos mamíferos impedem o deslocamento do colesterol e fosfolipídios de membrana
336 induzidas por estas proteínas, mantendo a viabilidade e motilidade dos espermatozoides durante o
337 armazenamento, representando a interação que confere proteção espermática quando o ejaculado

338 é diluído em meios específicos contendo caseína [14]. Em equinos, acredita-se que o mecanismo
339 de proteção contra o efluxo de lipídios da membrana plasmática desses meios seja semelhante, por
340 interação entre as proteínas do meio diluente com proteínas BSP [32]. Em bovinos [15,33] foi
341 demonstrado que as proteínas BSP's são capazes de se ligar a várias proteínas do leite; além das
342 micelas de caseína, ligam-se as α -lactalbumina e β -lactoglobulina, o que foi comprovado também
343 em suínos, equinos e ovinos. No entanto, garanhões apresentaram mais afinidade principalmente
344 a α -lactalbumina, β -lactoglobulina e k-caseína [33].

345 Por outro lado, Battelier et al. [5] propôs que algumas proteínas presentes no leite podem ser
346 prejudiciais e comparando com os resultados encontrados, possivelmente pode haver forte ligação
347 das BSPs às proteínas prejudiciais do plasma ou uma maior afinidade de ligação por estas proteínas
348 em asininos. Essa hipótese justificaria os resultados inferiores encontrados para todos os
349 parâmetros de integridade no grupo diluído em leite comparado ao grupo caseína na presença do
350 plasma em T48.

351 No presente estudo, a remoção do plasma seminal na refrigeração do sêmen asinino contendo
352 meio a base de caseína foi benéfica, com resultados superiores aos grupos contendo plasma
353 seminal. Possivelmente, a remoção do plasma seminal em asininos aliada a diluição em meios
354 específicos a base de caseína é eficiente no controle da capacitação precoce devido a afinidade de
355 micelas de caseína por BSPs e íons Cálcio, diminuindo a concentração de BSPs livres, impedindo
356 que se liguem à membrana espermática e provoquem perda lipídica, conferindo maior proteção
357 aos efeitos deletérios durante o armazenamento [12,33]. Contrariamente, Rota et al. [34]
358 descrevem que a retirada do plasma seminal pareceu ser prejudicial à motilidade progressiva às 24
359 e 48 horas de refrigeração em asininos, utilizando meio a base de leite (INRA 82) acrescido 2%
360 de gema de ovo.

361 Embora não sejam conhecidas a caracterização, identificação e funcionalidade das proteínas
362 BSPs no sêmen de asininos, o que foi descrito até o momento é que o plasma seminal desses

363 animais apresenta uma predominância de proteínas de 17kDa (SP-1). Também foram identificadas
364 CRISP 3, calicreína-1E2, prostaglandina-H2, D-isomerase, sérum albumina, clusterina, catalase e
365 anexina A1, todas presentes no plasma seminal de garanhões com exceção da anexina A1 e supõe-
366 se que devem estar relacionadas com a capacidade de fertilização [35]. Em estudo com garanhões
367 utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida associada a Western Blot, 4
368 proteínas foram significativamente correlacionadas (SP-1, SP-2, SP-3 e SP-4), onde SP-1 estava
369 positivamente correlacionada com a fertilidade, enquanto SP-2, SP-3 e SP-4 apresentaram
370 correlação negativa [36].

371 Tanto a gema de ovo quanto a caseína mantiveram elevada taxa de prenhez em éguas, em torno
372 de 73 a 93%, apresentando-se como boa alternativa para a manutenção da viabilidade espermática
373 pós-refrigeração do sêmen de asininos.

374 Devido a superioridade dos resultados utilizando-se meios a base de caseína e gema de ovo em
375 relação ao meio a base de leite desnatado sugere-se que, em jumentos, os espermatozoides não têm
376 boa interação com os componentes do leite. Por outro lado, o LDL da gema e as micelas de caseína
377 possibilitam uma maior interação na proteção das células espermáticas de jumentos.
378 Hipotetizamos que possivelmente os espermatozoides de jumentos possuam maior concentração
379 de lipídeos de membrana capazes de promover maior proteção às células durante o processo de
380 refrigeração, comparado ao espermatozoide equino. Assim, estudos lipidômicos e proteômicos são
381 necessários a fim de determinar as características específicas em asininos, bem como as reais
382 interações com as principais bases diluentes disponíveis no mercado, visando desenvolver meios
383 e protocolos de refrigeração que melhor se adequem à espécie.

384

385 **5. Referências**

386 [1] Avanzi BR, Farrás MC, Melo CM, Alvarenga MA, Dell'aqua Jr JA, Medeiros ASL, Araujo
387 GHM, Papa FO. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen

- 388 viability in a hot environment. *Animal Reproduction Science* 2006; 94(1-4): 152-54.
389 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.042>
- 390 [2] Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. Characterization of lower temperature storage
391 limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 1998; 50(4): 535-43.
392 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00159-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00159-9)
- 393 [3] Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE. Cooled and
394 Frozen Semen. Bulletin No. 9, Anim Reprod Biotec Labor 1999; Colorado State University, Fort
395 Collins, CO.
- 396 [4] Pommer AC, Linfor JJ, Meyers SA. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by
397 incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. *Theriogenology*
398 2002;57(5):1493-501. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00659-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00659-3)
- 399 [5] Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M.
400 Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 2001;68(3-4):181-90.
401 [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00155-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00155-5)
- 402 [6] Kareskoski AM, Reilas T, Andersson M, Katila T. Motility and plasma membrane integrity of
403 spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. *Reprod Domest Anim* 2006;41(1):33-
404 8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00647.x>
- 405 [7] Mattos RC, Schmitt FL, Oberst ER, Jobim MIM. Influência do plasma seminal de garanhões
406 de baixa e alta qualidade espermática na motilidade, integridade e funcionalidade de membrana
407 plasmática de espermatozoides resfriados a +4°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*
408 2003;27:336-38.
- 409 [8] Miró J, Taberner E, Rivera M, Peña A, Medrano A, Rigau T, Peñalba A. Effects of dilution
410 and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell
411 subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 2009;72(8):1017-22.
412 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.012>

- 413 [9] Rodrigues LT, Sousa FEMR, Canuto LEF, Silva LFMC, Andrade Jr LRP, Oliveira SN,
414 Alvarenga MA, Dell'aqua Jr JÁ, Papa FO. Efeito de diferentes diluentes e da remoção do plasma
415 seminal na refrigeração do sêmen asinino (*Equus asinus*). Revista Acadêmica Ciência Animal
416 2018;15:143-44. [doi:10.7213/academica.15.S01.2017.71](https://doi.org/10.7213/academica.15.S01.2017.71)
- 417 [10] Heitland AV, Jasko DS, Graham JK, Squires EL, Amann RP, Pickett BW. Motility and
418 fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing
419 egg yolk and liposome. Biol Reprod 1995;52(1):753-59.
420 https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.753
- 421 [11] Amman RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE,
422 Varner DD. 2 ed. Wiley-Blackwell Equine Reprod 2011;1:1062-64.
- 423 [12] Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by
424 extender components. Anim Reprod 2012;9(4):809-15.
- 425 [13] Campos GA, Garcia VC, Freitas-Dell'Aqua CP, Segabinazzi LGTM, Maciel LFS, Alvarenga
426 MA, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA. Sodium caseinate and cholesterol improve Bad cooler stallion
427 fertility. Journal of Equine Veterinary Science 2020;93:1-5.
- 428 [14] Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, Manjunath P. Milk caseins decrease the binding of the
429 major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane
430 during sperm storage. Biol Reprod 2007;77(1):120-6.
431 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058248>
- 432 [15] Lusignan MF, Bergeron A, Lafleur M, Manjunath P. The major proteins of bovine seminal
433 plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. Biol Reprod 2011;85(3):457-64.
434 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.089961>
- 435 [16] Manjunath P, Bergeron A, Lefebvre J, Fan J. Seminal plasma proteins: functions and
436 interaction with protective agents during semen preservation. Society of Reproduction and
437 Fertility Supplement 2007;65:217.

- 438 [17] Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm
439 membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J. Reprod Immunol* 2002;53(1-
440 2):109-19. [https://doi.org/10.1016/S0165-0378\(01\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0378(01)00098-5)
- 441 [18] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci* 2008;107(3-
442 4):268-75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015>
- 443 [19] Carneiro JA, Canisso IF, Bandeira RS, Scheeren VFC, Freitas-Dell'aqua CP, Alvarenga MA,
444 Papa FO, Dell'aqua Jr JA. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions
445 classified as having good or bad semen freezing ability. *Anim Reprod Sci* 2018;192:107-18.
446 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.020>
- 447 [20] Blom E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new
448 classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med* 1973;25:383-91.
- 449 [21] Parrish JJ, Susko-parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin.
450 *Biol Reprod* 1988;38,1171–80. <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- 451 [22] Batellier F, Magistrini M, Fauquant J, Palmer E. Effect of milk fractions on survival of equine
452 spermatozoa. *Theriogenology* 1997;48(3):391-410.
453 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00250-1)
- 454 [23] Pagl R, Aurich JE, Müller-schlösser F, Kankofer M, Aurich C. Comparison of an extender
455 containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine
456 semen at 5° C. *Theriogenology* 2006;66(5):1115-22.
457 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.006>
- 458 [24] Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejanertte JM, Marshall CE. Fluorometric assessments
459 of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*.
460 1997; 57:1401-06. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1401>

- 461 [25] Valença RMB, Guerra MMP. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de
462 antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2007;
463 31(1): 47-53.
- 464 [26] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The effect of reactive
465 oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane
466 potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl.* 2000; 21 (6): 895-
467 902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
- 468 [27] Ortega-Ferrusola C, González-Fernández L, Muriel A, Macías-García B, Rodríguez-Martínez
469 H, Tapia JA, ... & Peña FJ. Does the microbial flora in the ejaculate affect the freezeability of
470 stallion sperm?. *Reproduction in domestic animals* 2009; 44(3): 518-22.
471 <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01267.x>
- 472 [28] Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility and
473 oxidative stress. *Biology of Reproduction* 2014; 91: 1-10.
474 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539>
- 475 [29] Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and
476 preservation in the horse. *Anim Reprod Sci* 2008;107(3-4):257-67.
477 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- 478 [30] Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as
479 detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 2007;67(3):580-89.
480 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.021>
- 481 [31] Burnaugh L, Bola BA, Sabeur K, Thomas AD, Meyers SA. Osmotic stress stimulates
482 generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Anim Reprod Sci* 2010;117(3-4):249-
483 60. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.014>
- 484 [32] Ménard M, Nauc V, Lazure C, Vaillancourt D, Manjunath P. Novel purification method for
485 mammalian seminal plasma phospho-lipid-binding proteins reveals the presence of a novel

- 486 member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Molec Reprod & Develop* 2003; 66:
487 349–57. <https://doi.org/10.1002/mrd.10369>
- 488 [33] Plante G, Lusignan M, Lafleur M, Manjunath, P. Interaction of milk proteins and Binder of
489 Sperm (BSP) proteins from boar, stallion and ram semen. *Reprod Biol Endocrinol* 2015; 13(1):
490 92.
- 491 [34] Rota A, Magelli C, Panzani D, Camillo F. Effect of extender, centrifugation and removal of
492 seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. *Theriogenology* 2008; 69(2):
493 176-85. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.003>
- 494 [35] Schmith RA, Guasti PN, Camargo LS, Oliveira PV, Andrade LRP, Cavalero T, Souza FF,
495 Papa FO. Protein profile of the seminal plasma of donkey jack (*Equus asinus*). In: 18th
496 International Congress on Animal Reproduction 2016; Tours. Abstract book of 18th ICAR, 2016;
497 p.95.
- 498 [36] Brandon, C. I., et al. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal
499 plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52.5 (1999): 863-73.
500 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00178-8)