

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 09/03/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ADIÇÃO DA GELATINA AO MEIO DILUENTE DE  
REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

LUCAS EMANUEL FERREIRA CANUTO

Botucatu, São Paulo  
Março de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ADIÇÃO DA GELATINA AO MEIO DILUENTE DE  
REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

LUCAS EMANUEL FERREIRA CANUTO

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária.

**Orientador:** Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu, São Paulo  
Março de 2023

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

Canuto, Lucas Emanuel Ferreira.

Adição da gelatina ao meio diluente de refrigeração de  
sêmen equino / Lucas Emanuel Ferreira Canuto. - Botucatu,  
2023

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa  
Capes: 50504002

1. Cirrose hepática. 2. Colágeno. 3. Espermatozoides.  
4. Equino - Sêmen. 5. Gelatina. 6. Refrigeração.

Palavras-chave: Colágeno; Equino; Espermatozoide;  
Gelatina; Refrigeração.

Nome do Autor: Lucas Emanuel Ferreira Canuto

Título: ADIÇÃO DA GELATINA AO MEIO DILUENTE DE  
REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu

Prof. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu

Dr<sup>a</sup>. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu

Dr. Edjalma Rodrigues da Silva Junior

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal FMV- UNESP, Araçatuba

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Médico Veterinário Autônomo

Data da defesa: 09 de março de 2023

## Agradecimentos

A Deus, por ter colocado pessoas tão especiais e importante no meu caminho.

Aos meus pais, Josué Canuto e Josefa Ferreira, e minhas irmãs Bárbara e Débora. Por todo carinho e amor que sempre demonstraram por mim em todos os momentos. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês!

À Camila Trinque, pelo companheirismo, paciência e ajuda em todos os momentos difíceis. Sempre serei grato por tudo o que fez e faz em minha vida. Este momento também é seu.

Aos colegas e amigos do CERAN, pelo apoio e amizade durante este período. Foram muito importantes para a realização deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Alagoas, pela minha formação acadêmica fundamental em meus avanços profissionais.

À Capes pela bolsa de estudo concedido durante o projeto de pesquisa, e a Botupharma pela doação de materiais para execução da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador Professor Dr. Frederico Ozanam Papa, pela amizade e ensinamentos preciosos desde a residência, grande exemplo de dedicação e profissionalismo, por ter confiado em minha capacidade profissional e minhas ideias durante esse experimento.

Aos Funcionários do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu, Edilson, Edvaldo e Felipe, pelos bons momentos de convívio e pela ajuda.

Aos Professores Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal FMVZ – UNESP, Botucatu pelo grande apoio, amizade, ensinamentos e conselhos ao longo dos últimos anos.

Ao Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior pela ajuda na idealização da pesquisa.

Á Dra. Camila Dell’Aqua por toda a ajuda na idealização e execução da pesquisa.

Ao Haras Agromen e ao Veterinário Cassio Trinque por ter oferecido os animais para o experimento.

Ao Haras Paint Collection e ao Veterinário Rafael por ter oferecido os animais para o experimento.

A todos os Pós-Graduandos do CERAN, principalmente aos que ajudaram diretamente na execução do experimento, Camila Trinque, Raiza Rocha, Mariana Frasson, pela ajuda, convivência, troca de conhecimentos, amizade que tornaram os dias tão agradáveis durante esse período.

Aos inúmeros estagiários que sempre ajudaram e trocaram conhecimentos e experiências.

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram na elaboração e desenvolvimento deste trabalho.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CASA: análise computadorizada de movimento espermático

°C: graus Celsius

ERO's: espécies reativas de oxigênio

h: hora

HTMO: Hamilton Thorne Research

IA: inseminação artificial

IMP: integridade de membrana plasmática

mL: mililitro

MP: motilidade progressiva

MT: motilidade total

pH: potencial Hidrogeniônico

RAP: número de espermatozoides rápidos

VAP: velocidade de trajeto

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade linear progressiva

μL: microlitro

μm/s: micrômetro por segundo

**LISTA DE TABELAS**

## Capítulo 1

- Tabela 1. Valores de média e desvio padrão da cinética espermática de garanhões bons refrigeradores na temperatura 5°C, com diferentes concentrações de gelatina (0, 1 e 2%) avaliados em 24, 48 e 72h de refrigeração, nos tempos de aquecimento a 37°C (10 e 60 minutos)  
.....42
- Tabela 2. Valores de média e desvio padrão da cinética espermática de garanhões bons refrigeradores na temperatura 15°C, com diferentes concentrações de gelatina (0, 1 e 2%) avaliados em 24, 48 e 72h de refrigeração, nos tempos de aquecimento a 37°C (10 e 60 minutos)  
.....43
- Tabela 3. Valores de média e desvio padrão da cinética espermática de garanhões maus refrigeradores na temperatura 5°C, com diferentes concentrações de gelatina (0, 1 e 2%) avaliados em 24, 48 e 72h de refrigeração, nos tempos de aquecimento a 37°C (10 e 60 minutos)  
.....44
- Tabela 4. Valores de média e desvio padrão da cinética espermática de garanhões maus refrigeradores na temperatura 15°C, com diferentes concentrações de gelatina (0, 1 e 2%) avaliados em 24, 48 e 72h de refrigeração, nos tempos de aquecimento a 37°C (10 e 60 minutos).  
.....45
- Tabela 5. Valores médios e erro padrão, dos parâmetros de cinética espermática avaliados 10 minutos pós-refrigeração nos tempos 24, 48 e 72 horas de refrigeração à 5°C.  
.....46
- Tabela 6. Valores médios e erro padrão, dos parâmetros de integridade de membrana plasmática acrossomal, peroxidação lipídica, potencial de membrana plasmática pela estabilidade da membrana, potencial mitocondrial, avaliados pós-refrigeração nos tempos 24, 48 e 72 horas de refrigeração à 5°C.  
.....46



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 3. Organograma do processamento das amostras no experimento 1. O sêmen colhido foi dividido em nove grupos: BS[ ]0%, BS[ ]1%, BS[ ]2% BotuSÊMEN® (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0, 1 ou 2% de gelatina, BSS[ ]0%, BSS[ ]1%, BSS[ ]2% BotuSÊMEN® SPECIAL (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0, 1 ou 2% de gelatina, e BSG[ ]0%, BSG[ ]1%, BSG[ ]2% BotuSÊMEN® GOLD (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0, 1 ou 2% de gelatina. Esses nove grupos foram duplicados e armazenados em duas temperaturas diferentes (5 e 15°C), e avaliados nos momentos 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

.....34

Figura 4. Organograma do processamento das amostras no experimento II. O sêmen colhido foi dividido em dois grupos: BSG[ ]0% e BSG[ ]2% BotuSÊMEN® GOLD (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0 ou 2% de gelatina. As amostras foram armazenadas a 5°C, e avaliadas nos momentos 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

.....39

Figura 3. Fotografia demonstrando a precipitação espermática (pellet) nos tubos 1,2 e 3, que apresentam 0% de gelatina, ao lado os demais grupos com ausência do pellet (grupos com 1 ou 2% de gelatina). 1-BS[ ]0%, 2-BSS[ ]0%, 3-BSG[ ]0%, 4-BS[ ]1%, 5-BSS[ ]1%, 6-BSG[ ]1%, 7-BS[ ]2%, 8-BSS[ ]2%, 9- BSG[ ]2%.

.....41

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. Armazenamento de sêmen equino .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2. Refrigeração do sêmen do equino .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Metabolismo espermático .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4. Efeitos da refrigeração sobre a célula espermática .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Meio diluente na refrigeração de sêmen .....</b>	<b>19</b>
<b>2.6. Gelatina .....</b>	<b>20</b>
<b>2.7. Efeitos da matriz gelatinosa na refrigeração de sêmen .....</b>	<b>22</b>
<b>3. HIPÓTESE .....</b>	<b>23</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Objetivo geral .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>5. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>24</b>
ARTIGO .....	31
<b>Resumo .....</b>	<b>31</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>32</b>
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 EXPERIMENTO I .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 EXPERIMENTO II .....</b>	<b>34</b>
<b>2.3 Animais e local da pesquisa .....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 Colheita e análise do sêmen .....</b>	<b>35</b>
<b>2.5 Refrigeração e avaliação espermática .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5.1 Refrigeração .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5.2 Cinética espermática .....</b>	<b>36</b>
<b>2.5.3 Integridade das membranas plasmática acrossomal, estabilidade de membrana, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>3 Resultados .....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 EXPERIMENTO I: Comparação entre diferentes concentrações de gelatina, .....</b>	<b>38</b>
<b>temperaturas 5 e 15 °C, diluentes, e classificação de garanhões .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 EXPERIMENTO II: .....</b>	<b>45</b>

<b>4</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Referências</b> .....	<b>50</b>

## RESUMO

A refrigeração de sêmen é uma biotecnologia que dá suporte para a reprodução equina. Nessa técnica o sêmen acrescido de meio diluente, no estado líquido, é submetido a diminuição da temperatura para 5 e 15°C, proporcionando redução do metabolismo espermático e aumento da sua vida útil. No entanto, há um decréscimo da viabilidade espermática após 24 horas de refrigeração, sendo um dos motivos a sedimentação dos espermatozoides para o fundo do recipiente com conseqüente oscilação do pH e, embora o metabolismo continue em menores proporções, há produção de substâncias prejudiciais ao sêmen. Uma alternativa a esse problema seria a utilização de meio diluente mais viscoso ou até sólido dificultando a sedimentação espermática. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética e integridade da membrana plasmática, em sêmen equino refrigerado em meio diluente com adição de gelatina. A pesquisa foi dividida em duas etapas, no experimento I utilizou-se 6 garanhões, cada ejaculado colhido foi dividido em nove grupos: BS[]0%, BS[]1%, BS[]2%, BSS[]0%, BSS[]1%, BSS[]2%, BSG[]0%, BSG[]1%, BSG[]2%, onde as letras representam os meios BotuSÊMEN®-BS, BotuSÊMEN® SPECIAL-BSS, BotuSÊMEN® GOLD-BSG, e ‘[]’ referem-se a porcentagem da concentração de gelatina (0, 1 e 2%), e refrigerados a 5 e 15°C. No experimento II utilizou-se 20 garanhões, e cada ejaculado foi dividido em dois grupos BSG[]0% ou BSG[]2%, e refrigerado a 5°C. Os grupos foram refrigerados e avaliados nos momentos 24, 48 e 72 horas. A adição de gelatina, foi eficaz em mudar o estado físico, de líquido para sólido, sendo totalmente revertido, após aquecimento a 37°C até 10 minutos. É possível concluir que a adição de gelatina, nas concentrações de 1 e 2%, ao meio diluente de refrigeração equino não prejudicou a MT, MP e RAP, mas diminuiu as velocidades VAP, VSL e VCL. A gelatina na concentração de 2% não prejudicou a integridade de membrana acrossomal nem aumentou a peroxidação lipídica. Sendo necessário mais estudos na área com avaliação de novos parâmetros espermáticos e fertilidade.

**Palavras-chave:** equino, refrigeração, espermatozoide, gelatina, colágeno

## ABSTRACT

Semen cooling is a biotechnology that supports equine reproduction. In this technique, the semen plus diluent medium, in the liquid stage, is subjected to a decrease in temperature to 5 or 15°C, providing a reduction in sperm metabolism and an increase in its useful life. However, there is a decrease in sperm viability after 24 hours of refrigeration, one of the reasons being the sedimentation of spermatozoa to the bottom of the container with consequent pH oscillation and, although metabolism continues in smaller proportions, there is production of substances harmful to semen. An alternative to this problem would be the use of a more viscous or even solid diluent medium, making sperm sedimentation difficult. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the kinetics and integrity of the plasma membrane in equine semen refrigerated in diluent medium with the addition of gelatin. The research was divided into two stages, in experiment I 6 stallions were used, each ejaculate collected was divided into nine groups: BS[0], BS[1], BS[2], BSS[0], BSS[1], BSS[2], BSG[0], BSG[1], BSG[2], where the letters represent BotuSÊMEN®-BS, BotuSÊMEN® SPECIAL-BSS, BotuSÊMEN® GOLD -BSG, and "[ ]" refer to the percentage of gelatin concentration (0, 1 or 2%), and refrigerated at 5 or 15°C. In experiment II, 20 stallions were used, and each ejaculate was divided into two groups BSG[0] or BSG[2], and refrigerated at 5°C. The groups were refrigerated and evaluated at 24, 48 and 72 hours. The addition of gelatin was effective in changing the physical state from liquid to solid, being completely reversed after heating at 37°C for up to 10 minutes. It is possible to conclude that the addition of gelatin, at concentrations of 1 or 2%, to the diluent medium of equine cooling did not harm MT, MP and RAP, but decreased VAP, VSL and VCL velocities. Gelatin at a concentration of 2% did not impair the integrity of the acrosomal membrane or increase lipid peroxidation. More studies are needed in the area with evaluation of new sperm parameters and fertility.

Key-words: equine, refrigeration, sperm, gelatin, collagen

## 5. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, n. 6, p. 204-209, 2009.

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.

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

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

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

AVANZI, B.R.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR., J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAÚJO, 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, 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, p. 181-190, 2001.

BELSTRA, B. On-farm semen receiving, storage and use for a successful AI program. **Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar**. Clinton, North Carolina, USA. 2007, 9 p.

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, p. 129-36, 2000.

BUCCI, D.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; VALLORANI, C.; SPINACI, M.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. GLUTS and mammalian sperm metabolism. **Journal of Andrology**. v.32. p.348-355. 2011.

CORCINI, C. D.; MOREIRA, F.; PIGOZZO, R.; VAREJA Jr. A. S.; TORRES, N. U.; LUCIA, Jr. T. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination

with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. **Livestock Science**, v. 138, p. 289-292, 2011.

CREMERS, H. F. M.; FEIJEN, J.; KWON, G.; BAE, Y. H.; KIM, S. W.; NOTEBORN, H. P. J. M. e MCVIE, J. G. **FOOD INGREDIENTS BRASIL**, 2013. Gelatina um agente gelificante único e natural, N 27,43-47, ([https://revistafi.com/upload\\_arquivos/201606/2016060031938001467051128.pdf](https://revistafi.com/upload_arquivos/201606/2016060031938001467051128.pdf))

FARRÁS, M. C.; AVANZI, B. R.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; PAPA, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen eqüino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 693-699, 2008.

FOOTE, R. H.; YOUNG, D. C. e DUNN, H. O. Fertility of bull semen stored for one and two days at 5°C in 20% yolk-citrate-glycine-glucose extenders. **Journal of Dairy Science**, v. 41, p. 732, 1958.

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.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. **BioMed Research International**, v. 2016. (2016), p. e9380609.

GRAHAM JK. Principles of cooled semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. **Equine Reproduction**. 2 ed. New Delhi: Wiley-Blackwell; 2011. p.1308-131

GUASTI, P.N.; SOUZA, F.F.; SCOTT, C.; PAPA, P.M.; CAMARGO, L.S.; SCHMITH, R.A.; MONTEIRO, G.A.; HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O. Equine seminal plasma and sperm membrane: functional proteomic assessment. **Theriogenology**, v.156, p. 70–81, 2020.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Papel de antioxidants na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 187-195, 2004.

HARTWIG, F. P.; LISBOA, 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.

HERNÁNDEZ, A. C.; RAMÍREZ-AGÁMEZ, L.; LOVE, C. C.; FRIECRICH, M.; PEARSON, M.; KELLEY, D. E.; BECKHAM, A. M. N.; TEAGUE, S. R.; LACAZE, K. A.; BRINSKO, A. P.; VARNER, D. D. The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. **Theriogenology**, v.161, p. 83-97, 2021.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

JOHANNISSON. A.; LUNDGREN. A.; HUMBLLOT. P.; MORRELL. J. M.; Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. **Animal**, v. 8(10), p. 1706-1714. 2014. doi:10.1017/S1751731114001499.

JOHNSTON-BANKS, F. A. Gelatin. **In: Harris P** (Ed.), Food gels. London: Elsevier Applied Science Publishers, p. 233-289, 1990.

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

LECLERC, P.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Interaction between Ca<sup>2+</sup>, cyclic 3', 5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. **Journal of andrology**, v. 19. p. 434-43, 1998.

LÓPEZ, G. F.; SANCHES, G.; SANCHO, M. Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 252-260, 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, p. 1854-1591, 2005.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809-815, 2012.

MAXWELL, W. M.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 613-638, 1993.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, p. 287-301, 2010.



MILOVANOV, V. K. (1962). ['Biology of Reproduction and Artificial Insemination of Animals.'] (Seljhozizdat: Moscow.) (In Russian.)

MILOVANOV, V. K. The present state of storage and transport of semen of farm animals. **Trudy Lab. Zskusst. Osem. Zivotn**, Moscow, v. 1, p. 85-107, 1940.

MILOVANOV, V. K.; NAGORNIJ, E. P.; SIVOKONJ, V. G.; MALAHOV, K. I. Insemination of sheep with gelatinised semen. **Probl. Zhivotn**, v. 6, p. 53-72, 1937, (In Russian.)

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.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, p. 999-1012, 1992.

NAGORNIJ, E. P. and SMIRNOV, I. V. Insemination of ewes by the capsule method.] **Trudy Lab. Zskusst. Osem. Zhivotn.**, Moscow, v. 1, p. 152-5, 1940 (In Russian.)

NAGY, S. Z; SINKOVICS, G. Y.; KOVACS, A. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. **Animal Reproduction Science**, v. 70, n. 3-4, p. 283-286, 2002. doi: 10.1016/s0378-4320(01)00189-0.

NUNES, D. B.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; SILVA, E. V. C. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 42-56, 2006.

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.

PIMENTEL, C. A.; CARNEIRO, G. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução de Equinos**. In: Gonçalves BDG, Figueiredo RF, Freitas VJF. 2ªed. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, São Paulo: Roca, 2008, p.145-159.

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.

PROVINCE, C. A.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 23, n. 6, p. 925-934, 1985.

PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores. **Universidade Federal de Viçosa**, 2009.

RAJENDER, S.; RAHUL, P.; MAHDI, A. A. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. **Mitochondrion**, v.10, p.419-428, 2010.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 141–146, 1995.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.

SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.; VIUDES, D. E.; CASTRO, M. P.; GÓMEZ, E. A.; SILVESTRE, M. A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, 974-981, 2006.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 684–87, 2015.

SHORE, M.D.; MACPHERSON, M.L.; COMBES, G.B.; VAMER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v. 50, p. 693-698, 1998.

SIMMET, C.; RATH, D.; LORTON, S. Dose sedimentation of liquid boar semen influence semen quality during storage? **Proceedings of the 15th IPVS Congress**. Birmingham, England. v. 3, p. 62, 1998.

STOREY, B. T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 52. p. 427-437, 2008.

VANDEMARK, N. L.; SHARMA, U. D. Preliminary fertility results from the preservation of bovine semen at room temperature. **Journal Dairy Science**, v. 40, p. 438-9, 1957.

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

VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; BLISS, S. B.; CARROL, B. S.; MACPHERSON, M. L. Breeding-Management Strategies and Semen-Handling Techniques for Stallions-Case Scenarios In: **Proceedings of the 56th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, Baltimore, Maryland, USA, p. 56, 2010.

VARNER, D.; JOHNSON, L. From a Sperm's View – Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. **AEEP Proceedings**, v. 53, p. 104-77, 2007.

VYT, P.; MAES, D.; DEJONCKHEERE, E.; CASTRYCK, F.; VAN SOOM, A. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 39, p. 8–12, 2004

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

WIEBKE, M.; HENSEL, B.; NIETSCHÉ-MELKUS, E.; JUNG, M.; SCHULZE, M. Cooled storage of semen from livestock animals (part I): boar, bull and stallion. **Animal Reproduction Science**, p. 106822, 2021.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**. v.2. 2008.

YÁNIZ, J.; MARTÍ, J. I.; SILVESTRE, M. A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J. L.; LÓPEZ, G. F. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology**, v. 64, p.1844-1851, 2005.

**ARTIGO**

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN: 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS-CAPES de 2017

<https://www.journals.elsevier.com/theriogenology>

**Utilização do meio diluente no estado sólido sobre a qualidade espermática de sêmen equino refrigerado a 5 e 15 °C**

Canuto, L. E. F<sup>A</sup>, Papa, F.O<sup>A</sup>

**Resumo**

Na refrigeração, o sêmen é acrescido de meio diluente no estado líquido e submetido a baixas temperaturas, 5 e 15°C, reduzindo o metabolismo espermático e aumentando a sua vida útil. No entanto, há um decréscimo da viabilidade espermática após 24 horas de refrigeração, sendo um dos motivos a precipitação dos espermatozoides para o fundo do recipiente. Uma alternativa a esse problema seria a utilização de meio diluente mais viscoso ou até sólido dificultando a sedimentação espermática. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a cinética e integridade da membrana plasmática, em sêmen equino refrigerado em meio diluente com adição de gelatina. No experimento I utilizou-se 6 garanhões, cada ejaculado colhido foi dividido em nove grupos: BS[0], BS[1], BS[2], BSS[0], BSS[1], BSS[2], BSG[0], BSG[1], BSG[2], onde as letras representam os meios BotuSÊMEN<sup>®</sup>-BS, BotuSÊMEN<sup>®</sup> SPECIAL-BSS, BotuSÊMEN<sup>®</sup> GOLD-BSG, e “[ ]” referem-se a porcentagem da concentração de gelatina (0, 1 e 2%), e refrigerados a 5 e 15°C. No experimento II utilizou-se 20 garanhões, e cada ejaculado foi dividido em dois grupos BSG[0] ou BSG[2], e refrigerado a 5°C. Os grupos foram refrigerados e avaliados nos momentos 24, 48 e 72 horas. A adição de gelatina, nas concentrações de 1 e 2%, foi eficaz em mudar o estado físico, de líquido para sólido, sendo totalmente revertido, após aquecimento a 37°C até 10 minutos, e a utilização de gelatina não prejudicou a cinética espermática, mas diminuiu as velocidades VAP, VSL e VCL em função da transformação do meio totalmente líquido em viscoso.

Palavras-chave: garanhão, armazenamento, refrigeração, espermatozoide

dificuldade de troca dos constituintes do meio diluente, uma vez que ele não está líquido durante a refrigeração. Anteriormente foi relatado (Hunter et al., 2011) relataram que a viscosidade do meio que os espermatozoides se encontram está associada à diminuição da motilidade espermática, integridade da membrana e do acrossoma e atividade mitocondrial. Contudo são necessários mais estudos a fim de averiguar o impacto da gelatina perante a fertilidade.

## **5 Conclusão**

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que a adição de gelatina, nas concentrações de 1 ou 2%, a diferentes meios de refrigeração equino não prejudicou a MT, MP e RAP, mas diminuiu as velocidades VAP, VSL e VCL. A gelatina na concentração de 2% não prejudicou a integridade de membrana acrossomal nem aumentou a peroxidação lipídica. É necessário mais estudo na área com avaliação de novos parâmetros espermáticos e fertilidade.

## 6 Referências

- 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.
- BELSTRA, B. On-farm semen receiving, storage and use for a successful AI program. **Proceedings of the North Carolina Healthy Hogs Seminar**. Clinton, North Carolina, USA. 2007, 9 p.
- BRINSKO, S. P.; ROWAN, K. R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Effects of Transport Container and Ambient Storage Temperature on Motion Characteristics of Equine Spermatozoa. **Theriogenology**. v. 35. p. 1641-1655, 2000.
- CORCINI, C. D.; MOREIRA, F.; PIGOZZO, R.; VARELA, Jr. A. S.; TORRES, N. U.; LUCIA-JUNIOR, T. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. **Livestock Science**, v. 138, p. 289-292, 2011.
- CURRY, M. R. Cryopreservation of semen from domestic. **Reviews of Reproduction**, v. 5, p. 46-52, 2000.
- EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1039-1049, 1999.
- FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R. D.; DELL'AQUA, JR. J. A.; PAPA, F. O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 9, p. 941, 2012.
- FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; GUASTI, P. N.; PAPA, F. O.; CANISSO, I. F.; DELL'AQUA, JR. J. A. Superoxide anion is reduced in gradient selected cryopreserved stallion semen despite high mitochondrial potential. **Journal Equine Veterinary Science**, p. 66, 2018.
- GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G. M.; MAZIERO, R.R.; MARTIN, I.; AVANZI, B. R.; DELLAQUA, J. A.; PAPA, F. O. Effects of pentoxifylline on equine epididymal sperm. **Journal Equine Veterinary Science**, v.33, p. 1153-1156, 2013.

GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; MAZIERO, R. R. D.; MONTEIRO, G. A.; HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; PAPA, F. O. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide from subfertile stallion spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, p. 157-157, 2012.

GUTHRIE, H. D. e WELCH, G. R. "Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1, 3-butadienyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. **Journal of animal science**, v. 85, p. 1402-1411, 2007.

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

HUNTER, R. H; COY, P.; GADEA, J.; RATH, D. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. **Journal of Assisted Reproduction Genetics** v. 28, p.191-197, 2011.

JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, D. L.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241-1252, 1997.

LÓPEZ, G. F.; SANCHES, G.; SANCHO, M. Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. **Theriogenology**, v. 64, p. 252-260, 2005.

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.

NAGY, S. Z.; SINKOVICS, G. Y.; KOVÁCS, A. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 283-286, 2002.

NOVELLO, G.; PODICO, G.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; IMA, F. S.; CANISSO, I. F. Stallion Semen Cooling Using Native Phosphocaseinate-based Extender and Sodium Caseinate Cholesterol-loaded Cyclodextrin-based Extender. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 92, 2020.

PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG.2009.

ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; VÁZQUEZ, J. M.; LUCAS, X.; PARRILLA, I.; MARTÍNEZ, E. A. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. **Animal Reproduction Science**, v. 64, p. 103-112, 2000.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; RIGAU, T. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 141–146, 1995.

SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.; VIUDES DE CASTRO, M. P.; GÓMEZ, E. A.; SILVESTRE, M. A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5°C. **Theriogenology**, v. 66, p. 974-981, 2006.

SANTOS, F. C.; CORCINI, D. C.; COSTA, V. G; GHELLER, S. M.; NOGUEIRA, C. E.; CURSIO, B. R; VARELA, A. S. Jr. Effect Of Solid Medium During Cooled Storage On Stallion Sperm Parameters. **CryoLetters**, v. 36, p. 313-317, 2015.

SCHULZE, M.; RÜDIGER, K.; WABERSKI, D. Rotation of boar semen doses during storage affects sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 684–87, 2015.

SIMMET, C.; RATH, D.; LORTON, S. Dose sedimentation of liquid boar semen influence semen quality during storage? **Proceedings of the 15th IPVS Congress**. Birmingham, England. v. 3, p. 62, 1998.

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

YÁNIZ, J.; MARTÍ, J. I.; SILVESTRE, M. A.; FOLCH, J.; SANTOLARIA, P.; ALABART, J. L.; LÓPEZ, G. F. Effects of solid storage os sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. **Theriogenology**, v. 64, p. 1844-1851, 2005.