



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^a. Eunice Oba

Membro

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

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

4	Discussão	46
5	Conclusão	49
6	Referências	50

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

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A utilização de sêmen refrigerado, seguido do transporte, é empregado rotineiramente nas últimas décadas em todo o mundo, tornando-se popular por muitos programas de melhoramento genético de equinos (SHORE et al., 1988) por tornar possível a utilização de garanhões que estejam alojados em locais distantes da égua, facilitando a execução dos acasalamentos e logística de coleta e transporte do sêmen (NUNES et al., 2006).

Utilizar biotecnologias aplicadas à espécie equina é uma das maneiras para acelerar o ganho genético e competitividade na indústria do cavalo, o qual visa a conservação e transporte do material genético de animais de alto valor zootécnico para maximizar a sua utilização (ALVARENGA; PAPA, 2009)

A inseminação artificial (IA), com sêmen criopreservado, permite a utilização de reprodutores em momentos que não seria possível a monta natural ou a utilização do sêmen fresco. É o caso de animais que se encontram em campanhas esportivas, situações de comprometimento físico ou até mesmo que vieram a óbito. Esta biotecnologia possibilita ainda o transporte de sêmen a longas distâncias e um melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores (PIMENTEL e CARNEIRO, 2008).

Dentre as espécies domésticas, o garanhão é o que apresenta a maior variabilidade na qualidade do sêmen. Um dos principais motivos para ocorrência deste fato é devido aos critérios de seleção dos reprodutores, os quais levam em consideração apenas a genealogia, morfologia, desempenho atlético, e não os parâmetros de fertilidade (VARNER et al., 2010). Desta forma, há aumento da ocorrência de variabilidade entre garanhões em relação à qualidade e resistência espermática frente aos processos da criopreservação (BRINSKO et al., 2000).

No entanto, apesar dos benefícios, existem desafios para o uso da IA com sêmen criopreservado e que contribuem para a ocorrência de variações nos resultados de fertilidade (AURICH, 2008).

Para o desenvolvimento de técnicas de criopreservação, que visam o aumento da longevidade espermática, é necessário o seu entendimento metabólico. Os espermatozoides são células altamente especializadas que armazenam e transportam o material genético, possuindo as habilidades de motilidade ativa e fertilização do oócito (AURICH, 2005).

O armazenamento do sêmen em estado líquido, apesar de ser uma das principais formas de armazenamento, apresenta um efeito que é a sedimentação, ela ocorre devido ao repouso da dose de sêmen durante a refrigeração no estado líquido, fazendo com que

os espermatozoides, microrganismos e outras partículas presentes na amostra precipitem pela ação da gravidade. A formação de sedimento é considerada prejudicial à qualidade do sêmen, uma explicação para esse ocorrido é que devido ao acúmulo de metabólitos e a depleção da capacidade tamponante do diluente os espermatozoides sofrem ações desfavoráveis ao seu funcionamento (BELSTRA, 2007).

Uma alternativa para esse problema é a homogeneização ou rotação das doses de sêmen durante o armazenamento, que apesar de ser uma prática comum para algumas espécies, os estudos sobre os benefícios e efeitos dessa homogeneização são escassos e conflitantes. Alguns trabalhos mostram que a rotação das amostras favoreceu a qualidade espermática em comparação ao armazenamento sem rotação, já em outros a rotação das amostras causaram efeitos deletérios aos sêmen, acreditando que a flutuação do pH seja um motivo para o ocorrido (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995; SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015).

Sabe-se que o meio diluente em que os espermatozoides estão imersos tem um papel fundamental na cinética, integridade de membrana e na qualidade geral do sêmen, e que a rotação de doses inseminantes durante o armazenamento foi relacionada adversamente à qualidade espermática, de modo que a recomendação de homogeneização das doses em estado líquido está sendo desencorajada na espécie suína (SCHULZE et al., 2015).

Logo outra alternativa se faz necessário para evitar os efeitos deletérios da sedimentação e da homogeneização do sêmen refrigerado. Diversos estudos são realizados para avaliar o efeito da adição de substâncias como lipídeos, proteínas, antioxidantes e açúcares aos meios diluentes. No entanto, atualmente poucas pesquisas são realizadas com interesse de avaliar o efeito da viscosidade ou estado físico do meio diluente na refrigeração de sêmen.

Estudos anteriores foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento de sêmen em estado sólido. Em algumas espécies de mamíferos, a adição de gelatina ao meio diluente aumenta a fertilidade, parâmetros de cinética espermática e viabilidade, sendo elas: coelho (NAGY et al., 2002), ovinos (YANIZ et al., 2005), caprinos (SALVADOR et al., 2006) e suínos (CORCINI et al., 2011).

Desta forma, nota-se a importância e a necessidade de estudos na área de armazenamento de sêmen no estado sólido, para melhor compreensão da ação sobre os espermatozoides, esclarecimento das funções do estado físico do meio durante a refrigeração, e conseqüentemente melhoria na taxa de fertilidade dos espermatozoides equinos refrigerados a 5 e 15 °C.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Armazenamento de sêmen equino

As principais formas de armazenar sêmen visam diminuir o metabolismo celular, sendo por meio da diminuição da temperatura (criopreservação), gaseificando o meio diluente para diminuir a respiração celular ou de forma física, com uso de meio sólido para dificultar o movimento espermático e seu gasto energético, sendo ainda possível a utilização dessas técnicas em conjunto (MILOVANOV, 1940).

Os primeiros experimentos sobre o 'efeito inibitório' do dióxido de carbono sobre a motilidade dos espermatozoides de diferentes espécies foram realizados em 1924 por Krhyskovsky e Pavlov (citado em MILOVANOV, 1962). Mais de três décadas depois, esse método foi reexaminado e um novo diluente, chamado de diluente Illini Variable Temperature foi desenvolvido (VAN DEMARK e SHARMA, 1957). O diluente exigia gaseificação com dióxido de carbono antes do uso até o pH cair para 6,3. Outro diluente, também desenvolvido para armazenamento de sêmen de touro em temperatura ambiente, o Cornell University Extender, é um meio autogasificado em que o dióxido de carbono é derivado da reação de ácido cítrico e bicarbonato de sódio (FOOTE et al., 1958). A maioria desses diluentes são saturados e gaseificados com dióxido de carbono, até atingir o pH 6,3 por cerca de 10 minutos antes do uso, ou foram autocarbonatados como resultado de seu teor de carbonato ou bicarbonato e ácido (MAXWELL e SALAMON, 1993).

No entanto, a forma de armazenamento de sêmen por diminuição da temperatura é a técnica mais utilizada nas espécies domésticas, e apresenta papel importante prolongando a vida útil dos espermatozoides, pela redução do metabolismo celular. Embora nem todas as alterações associadas a menores temperaturas são benéficas para as células espermáticas (AURICHI e AURICH, 2006).

A refrigeração do sêmen necessita de um substrato para proteção durante o período de armazenamento, geralmente esse meio diluente está no estado líquido, com a diminuição do metabolismo e motilidade espermática, a sedimentação celular ocorre com facilidade e, conseqüentemente, o fundo do recipiente apresenta um aumento das espécies reativas de oxigênio provenientes do metabolismo e da morte de algumas células, esse evento promove flutuações do pH sendo um ponto desfavorável a técnica (NAGY et al., 2002).

O armazenamento em meio sólido pode ser benéfico por três motivos: 1) imobilização espermática reduzindo a demanda por energia e conseqüentemente diminuindo a produção espécies reativas de oxigênio, 2) Distribuição homogênea dos espermatozoides por todo substrato evitando a sedimentação e mudanças no pH e composição do meio (LÓPEZ et al., 2005) e 3) diminuição do refluxo seminal após a inseminação artificial (CORCINI et al., 2011).

2.2. Refrigeração do sêmen do equino

O transporte e armazenamento a curto prazo, 12-24 horas (h), de sêmen equino, a baixas temperaturas é amplamente utilizado no mundo (HERNÁNDEZ et al., 2021), sendo o Brasil e Estados Unidos os países que mais realizam IA com sêmen equino refrigerado (PAPA et al., 2005).

A grande aceitabilidade da técnica está correlacionada com as vantagens não vistas no processo de monta natural, como diminuição de traumas e doenças sexualmente transmissíveis durante a cópula, maior número de produtos nascidos, otimização do reprodutor, propagação de material genético com alta qualidade e baixo risco de consanguinidade dentro do criatório (MOORE et al., 2005). Portanto, as raças equinas que permitem a IA que utilizam o uso de sêmen refrigerado contribuem para o melhoramento genético na espécie (AURICH; AURICH, 2006).

Para refrigerar o sêmen equino é necessário que o arrefecimento da amostra seja realizado de forma gradativa, uma vez que a taxa de resfriamento rápida pode induzir lesão por choque frio (MORAN et al., 1992). Isto pode ser realizado por um sistema de refrigeração passivo ou ativo (KAYSER et al., 1992). No sistema passivo a taxa de refrigeração pode sofrer variação de acordo com a temperatura ambiente, isolamento do dispositivo, volume e temperatura inicial do sêmen (MORAN et al., 1992; KAYSER et al., 1992), por isso os recipientes usados para envio de sêmen devem manter temperatura interna adequada para realização de curva lenta de resfriamento, mesmo com altas temperaturas externas (AVANZI et al., 2006).

A temperatura de armazenamento recomendada, pela maioria dos autores, para o sêmen equino com diluente a base de leite desnatado varia de 4 a 6°C (VARNER et al., 1988; MORAN et al., 1992; GRAHAM, 2011; AURICH, 2008), no entanto Province et al. (1985) relatam uma temperatura de armazenamento de sêmen de 15 a 20 ° C ser melhor quando armazenado por 36 horas. Batellier et al. (2001) compararam a fertilidade do

sêmen com diluente a base de fração purificada do leite (INRA96[®]) armazenando a 4 ou 15°C por 24 h e encontraram resultados idênticos para os dois grupos.

Quando foi comparado diferentes diluentes e temperaturas de armazenamento, observou-se que a base de leite, ou componentes de leite podem ser utilizados sem prejuízos para a motilidade e viabilidade espermática, tanto a 15°C quanto a 5°C por 24 h (FARRÁS et al., 2008). Mas altas temperaturas de armazenamento, não reduzem suficientemente o metabolismo (GRAHAM, 2011), conservando as células espermáticas por menor tempo.

Embora a metodologia de refrigeração de sêmen esteja otimizando os danos causados, ainda há perda considerável na quantidade de células sendo estimada em torno de 40%-50% (WATSON, 2000).

A criopreservação, devido ao estresse térmico, danifica as células espermáticas, afetando a motilidade antes da IA e conseqüentemente a longevidade dessas células dentro do aparelho reprodutivo da égua (WIEBKE et al., 2021).

Os efeitos prejudiciais do procedimento são observados como peroxidação lipídica, alterações negativas a membrana plasmática e acrossomal, diminuição do potencial da membrana mitocondrial, elevado consumo de ATP intracelular (GIBB e AITKEN, 2016) e redução na motilidade (WIEBKE et al., 2021), embora alguns animais consigam permanecer com os parâmetros de cinética adequados, mas a integridade do DNA é afetada (LOVE et al., 2005).

Outro efeito prejudicial é a formação de sedimento, possivelmente devido ao acúmulo de metabólitos e à depleção da capacidade tamponante do diluente (BELSTRA, 2007), para tentar reparar esse efeito a homogeneização das amostras durante o armazenamento é utilizada, no entanto ela traz outra complicação que pode ser explicada pela perda acentuada de CO₂ do sêmen diluído para o compartimento com ar devido à agitação das doses, induzindo ao aumento do pH do meio (VYT et al., 2004). Inclusive acredita-se que a rotação das doses de sêmen exacerbe o estresse oxidativo (SCHULZE et al., 2015).

No entanto, as alterações criogênicas presentes nesse processo variam de espécie para espécie, devido a composição lipídica presente na membrana plasmática dos espermatozoides ser espécie específica (GARCÍA et al., 2011). Portanto, alguns animais, devido a maior sensibilidade ao processo de refrigeração, pela menor concentração de lipídios na membrana plasmática, tornam-se inviável ou impossível a realização dessa biotecnologia (HARTWIG et al., 2014).

Além dos efeitos correlacionados com os animais, a metodologia de escolha como temperatura, curva de refrigeração, diluente de escolha, caixa de transporte e tempo de armazenamento interferem na qualidade final (PUGLIESI, 2009).

2.3. Metabolismo espermático

Os gametas masculinos são responsáveis pela entrega do material genético paterno e ativação do oócito pós fertilização, para isso após a ejaculação o útero realiza contrações a fim de facilitar o caminho dos espermatozoides, no entanto esses devem possuir boa motilidade para percorrer o aparelho reprodutivo feminino (GIBB et al., 2016).

Sendo assim, para a cinética, os espermatozoides de mamíferos utilizam ATP intracelular (STOREY, 2008), sendo a glicose, na espécie equina, a maior fonte energética, a qual é proveniente da glicólise e fosforilação oxidativa (VARNER e JOHNSON, 2007).

Durante a fase de espermatogênese, o DNA das células germinativas masculina é compactado chegando a corresponder apenas 10% do núcleo de uma célula somática (MILLER et al., 2010). Portanto, no processo de remodelação, grande parte do citoplasma celular é removido ou reabsorvido e por consequência a maioria das organelas responsáveis pelo metabolismo celular (retículo endoplasmático, ribossomos e complexo de Golgi) também são eliminadas, comprometendo o metabolismo celular (GIBB et al., 2016).

Sendo assim, a fonte de energia ofertada para os espermatozoides é de fundamental importância para a motilidade e alterações funcionais para permitir a capacidade fertilizante dessas células, e devido as alterações morfológicas, durante a espermatogênese e a escassa reserva energética, os espermatozoides são dependentes do meio em que se encontram para realizar atividades enzimáticas e como fonte energética (BUCCI et al., 2011).

Dessa maneira, após serem maturados no epidídimo os espermatozoides necessitam de um meio com condições favoráveis e fontes de energia para manutenção da motilidade (YANAGIMACHI, 2008).

2.4. Efeitos da refrigeração sobre a célula espermática

Após a colheita do sêmen, o ejaculado equino encontra-se aproximadamente a 35°C e durante o processo de refrigeração, a medida em que a temperatura decresce, ocorrem mudanças estruturais na organização dos ácidos graxos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides fazendo com que essa passe do estado fluido para gelatinoso (AMANN; GRAHAM, 2011).

A refrigeração diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, reduzindo também o crescimento e a atividade microbiana (AURICH, 2008). A queda do metabolismo é de cerca de 50% a cada 10°C de refrigeração. Quando o sêmen é mantido a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo é necessário para sua sobrevivência. Desta forma, a temperatura reduzida tem sido o principal meio de retardar as reações químicas e prolongar a fertilidade dos espermatozoides por longos períodos (NUNES et al., 2006).

Todavia, durante o processo de criopreservação ocorre o estresse oxidativo, que é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e a de antioxidantes, onde, respectivamente, há aumento da produção de ERO's ou uma diminuição de antioxidantes (PISOCHI; POP, 2015).

As ERO's, são produzidas por todas as células metabolizadoras, como os espermatozoides (JOHANNISSON et al., 2014). Fisiologicamente, os efeitos negativos, causados pelas ERO's, são diminuídos pela ação dos antioxidantes presentes tanto no plasma seminal quanto no sistema genital feminino, e a presença dessas substâncias estão correlacionadas positivamente com ativação espermática (LECLERC et al., 1998), maturação, capacitação, ligação a zona pelúcida e fertilização (RAJENDER et al., 2010).

A presença dos ERO's, em técnicas de transporte e armazenamento, está associada com a produção dos subprodutos gerados pelos danos causados a membrana plasmática, ocorrências de células espermáticas não viáveis e/ou com defeitos morfológicos maiores e menores, e pela morte celular (BALL et al., 2001).

No entanto, sabemos que durante a refrigeração, os danos causados por esses subprodutos são minimizados pela baixa temperatura, 4°C a 10°C, uma vez que o metabolismo celular é diminuído (GIBB et al., 2016).

2.5. Meio diluente na refrigeração de sêmen

Os diluentes para refrigeração de sêmen equino têm como principais funções promover a redução da concentração plasmática, estabilizar o pH e a osmolaridade, além de fornecer aporte nutricional e antimicrobiano (PUGLIESI, 2009).

Diversos meios diluentes foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a viabilidade do sêmen refrigerado bem como aumentar a sua durabilidade mantendo as características desejáveis, como cinética e integridade de membrana plasmática, durante um período mais prolongado. Dentre os principais meios, podemos citar o que tem como base a gema de ovo e o leite integral, ou desnatado, como os mais comumente utilizados. A gema de ovo protege os espermatozoides contra o choque térmico, e geralmente é utilizada nas concentrações de até 20%, evidências indicam que a fração de lipoproteína de baixa densidade é o que fornece essa proteção a célula espermática (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Esses diluentes são de custo baixo, fáceis de preparar e resultam em taxas aceitáveis de fertilidade (AURICH, 2008). Entretanto, a proteção oferecida tanto pela gema de ovo quanto pelo leite durante a refrigeração do ejaculado é complexa e mal compreendida (MANJUNATH, 2012).

O leite integral, ou desnatado, também tem sido utilizado por muito tempo como meio diluente de sêmen. Para SALAMON e MAXWELL, (2000), o sucesso deste diluente tem relação com a fração proteica, que atua como um tampão contra variações do pH. Além de aumentar a proteção contra danos causados durante a curva de resfriamento.

Variações nos níveis de proteínas presentes nos espermatozoides e no meio em que se encontram pode influenciar na sobrevivência do esperma após a criopreservação, além de poder desempenhar um papel fundamental na diminuição da fertilidade, levando a crer que incremento ou retirada de certas proteínas do sêmen pode corrigir falhas de fertilidade (GUSTI et al., 2020)

Geralmente esses meios diluentes mais utilizados, apresentam um declínio quanto a qualidade espermática e fertilidade, quando armazenados e realizada a inseminação artificial por mais de 24 h. Esse fato pode ser atribuído, em parte, pela precipitação dos espermatozoides no fundo do tubo, e conseqüentemente diminuição do pH, uma vez que ele está em estado líquido, (MAXWELL e WATSON, 1996).

Tal problema pode alertar sobre a necessidade de homogeneização das amostras durante este período e sua distribuição no frasco de armazenamento. Outra alternativa seria a mudança do estado físico do meio diluente que se encontra líquido para o estado sólido durante o armazenamento refrigerado, o qual poder ser alcançado por meio da adição de gelatina.

2.6. Gelatina

A gelatina é um composto proteico solúvel obtido pela hidrólise parcial do colágeno, o principal constituinte de proteína fibrosa nos ossos, cartilagens e peles, principalmente de ruminantes ou suínos (JOHNSTON-BANKS, 1990).

Esse produto vem sendo utilizado há 3000 anos, os egípcios usavam como adesivo para móveis e em pratos sofisticados e extravagantes nos banquetes de reis e aristocratas no século XV. A primeira patente para a sua produção foi registrada na Inglaterra em 1754 (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Obtida a partir do colágeno, sua composição é de cerca de 86% de proteína, 2% de sais minerais e 12% água. Não contém gorduras nem colesterol, mas contém 18 aminoácidos. O colágeno possui em média 14% de hidroxiprolina, 16% de prolina e 26% de glicina, sendo que o aminoácido hidroxiprolina é usado para determinar o conteúdo de colágeno ou gelatina nos produtos finais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

O colágeno constitui até 30% da proteína humana total, com proporções semelhantes sendo encontradas em muitos outros animais. É difundido em vertebrados e invertebrados, de vermes marinhos primitivos a mamíferos, diferindo um pouco na composição de aminoácidos, mas fornecendo a mesma força de função e suporte para os tecidos e órgãos dos animais (JOHNSTON-BANKS, 1990).

A molécula de colágeno há uma hélice tripla, composta por três discretas cadeias, que adotam uma estrutura tridimensional em que os resíduos de glicina compactos ocupam cada terceiro sítio na cadeia, deixando um espaço relativo que os resíduos de hidroxiprolina e prolina nas outras duas cadeias ocupam: uma geometria ideal para ligações de hidrogênio intercadeias. Os aminoácidos também conferem um grau considerável de rigidez à molécula, favorecendo a estabilidade da ordem de longo alcance. Também é provável que as moléculas de água intersticiais desempenhem um papel crucial, atuando como pontes de ligação de hidrogênio para aumentar a estabilidade da hélice (JOHNSTON-BANKS, 1990).

Os géis se formam sob refrigeração e são termorreversíveis, podendo voltar ao estado líquido ao redor de 30 a 35°C. O ponto de fusão está relacionado ao valor de Bloom, que diz respeito a dureza da gelatina (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2013).

Quanto a biossegurança da gelatina, a sua utilização tem sido comprovada através de seu longo uso clínico como expansor de plasma, biomateriais cirúrgicos e ingrediente de medicamentos (CREMERS et al., 2013).

Em algumas espécies de mamíferos, a adição de gelatina ao meio diluente de sêmen aumenta a fertilidade, aumenta os parâmetros de cinética espermática e viabilidade, sendo elas: coelho (NAGY et al., 2002), ovinos (YANIZ et al., 2005), caprinos (SALVADOR et al., 2006) e suínos (CORCINI et al., 2011).

2.7. Efeitos da matriz gelatinosa na refrigeração de sêmen

A IA com o uso do sêmen refrigerado ainda apresenta desafios, principalmente devido aos resultados de fertilidade inferiores ao do sêmen fresco, provavelmente pela diminuição da viabilidade espermática no processo de refrigeração. Uma alternativa é a utilização de meios diluentes capazes de diminuir os efeitos deletérios da mudança de temperatura e tempo armazenado, mantendo as células viáveis por um maior período de tempo sem perda na qualidade seminal (AURICH, 2008).

No processo de refrigeração seminal a sobrevivência espermática junto a sua integridade funcional depende da distribuição espacial das células no meio diluente (HOLT, 2000), sendo deletério a sua aglutinação ou sedimentação, necessitando de homogeneização durante o seu armazenamento.

Quando o diluente é mais viscoso, ou quando é suplementado com gelatina, essa disposição espacial pode ser beneficiada, além de diminuir a demanda metabólica dos espermatozoides devido a redução da sua motilidade no resfriamento (LÓPEZ et al., 2005).

Relatos da primeira utilização de meio sólido para refrigeração de sêmen foram na antiga União Soviética em 1937 com adição de gelatina ao diluente glicose-fosfato, para aumentar a viscosidade do sêmen e concomitantemente diminuir a motilidade dos espermatozoides. Os quais relatam 53% de taxa de parto, após inseminação com sêmen de carneiro diluído em meio de glicose fosfato acrescido de gelatina e armazenado a 7-18°C por 20-25 h (MILOVANOV et al., 1937).

Para o transporte e inseminação, o sêmen diluído foi colocado em papel parafinado (MILOVANOV, 1940). E Nagornij e Smirnov (1940) tentaram inseminação vaginal de

ovelhas com cápsulas de gelatina contendo sêmen não diluído e alcançaram uma taxa de parto de 71% (82/115).

A ideia de armazenar os espermatozoides no meio em estado gelatinoso pode minimizar os efeitos de aglutinação das células no fundo do tubo, pelo fato da consistência dificultar, ou até impedir, a sedimentação espermática. Diminuindo o contato com os metabólitos advindos do metabolismo celular, e torna possível a manutenção do contato dos espermatozoides, de forma homogênea, com o meio diluente por toda extensão do tubo de armazenamento.

Os efeitos da redução da aglutinação, a imobilização e manutenção do contato homogêneo das células espermáticas com o meio, foi visto no trabalho de López et al. (2005), no qual espermatozoides de coelhos foram refrigerados em meio sólido reduzindo o gasto de energia, proporcionando aumento da viabilidade e capacidade fecundante por mais tempo quando comparado ao armazenamento em estado líquido.

Outro ponto importante a ser destacado é que a refrigeração, de sêmen de coelho em meio sólido, por até três dias, mantiveram as amostras com distribuição uniforme no recipiente sem a necessidade de agitação, a qual é realizada quando o armazenamento é feito em estado líquido, reduzindo os efeitos da oscilação de temperatura e pH (LÓPEZ et al., 2005).

A mudança no estado físico pode ser realizada apenas com adição de gelatina ao meio já conhecido e testado. Utilizando meios diluentes a base de leite integral com adição de 1,5% de gelatina na temperatura de refrigeração de 15 °C, o sêmen de carneiro apresentou melhores resultados de cinética espermática quando comparado ao grupo do mesmo diluente no estado líquido (YANIZ et al., 2005).

Outra vantagem relatada, quando se utilizou o meio contendo 1,5% de gelatina, foi o menor refluxo seminal após a inseminação de suínos, além da manutenção da qualidade espermática até 96 h de refrigeração (CORCINI et al., 2011). Podendo ser uma alternativa viável para espécies que necessitam de um maior volume de sêmen na inseminação artificial, uma vez que reduz a perda espermática com o refluxo após o procedimento.

A mudança do estado líquido para o estado sólido, do diluente suplementado com gelatina, aumentou os parâmetros de integridade acrossomal, cinética e prolongou a viabilidade seminal, além de demonstrar aumento nas taxas de fertilidade após inseminação artificial em sêmen de coelhos (NAGY et al., 2000; LÓPEZ et al., 2005).

Em estudos anteriores ainda não publicados, o diluente quando acrescido de gelatina, em temperatura ambiente se mantém em estado líquido e quando refrigerado, a

5 ou 15 °C, torna-se viscoso e o meio solidifica. Posteriormente ao período de refrigeração, tornou-se possível a volta ao estado líquido em temperaturas próximas à temperatura corporal dos mamíferos domésticos (37 °C), o que não seria um problema a sua utilização na IA. Assim, mesmo que ele ainda esteja em estado sólido no momento da IA, entrará em liquefação e liberação dos espermatozoides em até cinco minutos, (comunicação pessoal).

3. HIPÓTESE

A incorporação de matriz gelatinosa ao meio de transporte e refrigeração de sêmen equino possivelmente tornará melhor a qualidade espermática após a refrigeração sólida, devido a consistência do meio dificultar o movimento e precipitação dos espermatozoides para o fundo do tubo durante o período refrigerado.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Melhorar a qualidade espermática do sêmen refrigerado de garanhões e avaliar o efeito da adição de gelatina nas concentrações de 1% e 2% de diferentes diluentes de refrigeração de sêmen equino, a base de leite desnatado, durante o armazenamento à 5 e 15 ° C, sobre a qualidade seminal, durante: 24h, 48h e 72 h.

4.2. Objetivos específicos

- 1- Determinar a concentração mais adequada de matriz gelatinosa para a utilização na refrigeração de espermatozoides equinos.
- 2- Determinar qual meio diluente apresenta melhores valores de cinética espermática quando acrescido de gelatina.
- 3- Verificar o efeito da refrigeração nas temperaturas de 5° C e 15° C e a interação destas com o tratamento matriz gelatinosa sobre a cinética e integridade da membrana plasmática do sêmen equino.
- 4- Avaliar a influência da adição de matriz gelatinosa sobre cinética e integridade de membrana plasmática de sêmen refrigerado de garanhões.

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)

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 Ca²⁺, 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.

CAPÍTULO 1

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^A, Papa, F.O^A

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[®]-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, 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

1. Introdução

A indústria do cavalo tem como biotecnologia de grande importância a inseminação artificial com sêmen refrigerado, sendo fundamental realizar pesquisas nessa área de interesse, no entanto os estudos tem focado principalmente na adição de substâncias como antioxidantes, proteínas, açúcares aos meios diluidores, sendo eles sempre em estado líquido, mas pouco sabemos sobre as vantagens do armazenamento do sêmen equino em meio sólido.

Esse processo de refrigeração de sêmen, além das suas vantagens, ainda apresenta desafios, como a diminuição da qualidade espermática ao longo do armazenamento, sendo a preservação das características seminais após 24 horas de refrigeração um fator limitante para a aplicação desta biotecnologia reprodutiva (CURRY, 2000). Uma vez que o armazenamento por períodos superiores a 24 horas provoca redução na viabilidade seminal, afetando gradativamente sua qualidade (EVANS e MAXWELL, 1990).

O armazenamento do sêmen em estado líquido, é a mais utilizada, no entanto, apresenta um efeito que é a sedimentação espermática, fazendo com que os espermatozoides, microrganismos e outras partículas presentes na amostra precipitem pela ação da gravidade. Essa sedimentação é prejudicial à qualidade do sêmen, uma explicação para esse ocorrido é que devido ao acúmulo de metabólitos e a diminuição do pH no diluente, causam ações desfavoráveis ao funcionamento espermático (BELSTRA, 2007).

A homogeneização das doses de sêmen durante a refrigeração é uma alternativa, mas os resultados são controversos, pois efeitos deletérios aos sêmen foram causados pela homogeneização, acredita-se que a oscilação do pH seja um motivo para o ocorrido (RODRÍGUEZ-GIL & RIGAU, 1995; SIMMET et al., 1998; SCHULZE et al., 2015).

Logo outra alternativa para evitar a sedimentação, seria através do aumento da viscosidade ou estado físico do sêmen armazenado. Diversos estudos foram realizados para avaliar o efeito do armazenamento de sêmen em estado sólido. Em algumas espécies de mamíferos, a adição de gelatina ao meio diluente aumenta a fertilidade, parâmetros de cinética espermática e viabilidade, sendo elas: coelho (NAGY et al., 2002), ovinos (YANIZ et al., 2005), caprinos (SALVADOR et al., 2006) e suínos (CORCINI et al., 2011).

Além da melhora na qualidade espermática do sêmen suíno refrigerado com 1,5% de gelatina, que se manteve viável até 96 horas de refrigeração, o sêmen no estado sólido apresentou menor refluxo após a inseminação artificial, se mostrando uma alternativa viável em espécies que necessitam de alto volume na dose inseminante (CORCINI et al., 2011).

Nesse sentido o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição de gelatina no sêmen, de garanhões bons e maus refrigeradores, após um armazenamento de até 72 h de duração a 5 e 15 °C, sobre a integridade de membrana, peroxidação lipídica, potencial mitocondrial e cinética espermática.

2. Materiais e métodos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMZV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de Botucatu, São Paulo, sob protocolo CEUA n° 0070/2022.

O experimento foi dividido em duas etapas: A primeira para definir a concentração de gelatina, o diluente, e temperatura de refrigeração; A segunda etapa foi realizada com a concentração, diluente e temperatura que obtiveram melhores resultados na primeira etapa.

Os fluxogramas das amostras, experimento 1 e experimento 2, estão descritos, respectivamente, na Figura 1 e Figura 2.

2.1. EXPERIMENTO I: Comparação entre diferentes concentrações de gelatina, temperaturas 5 e 15 °C, diluentes, e classificação de garanthões

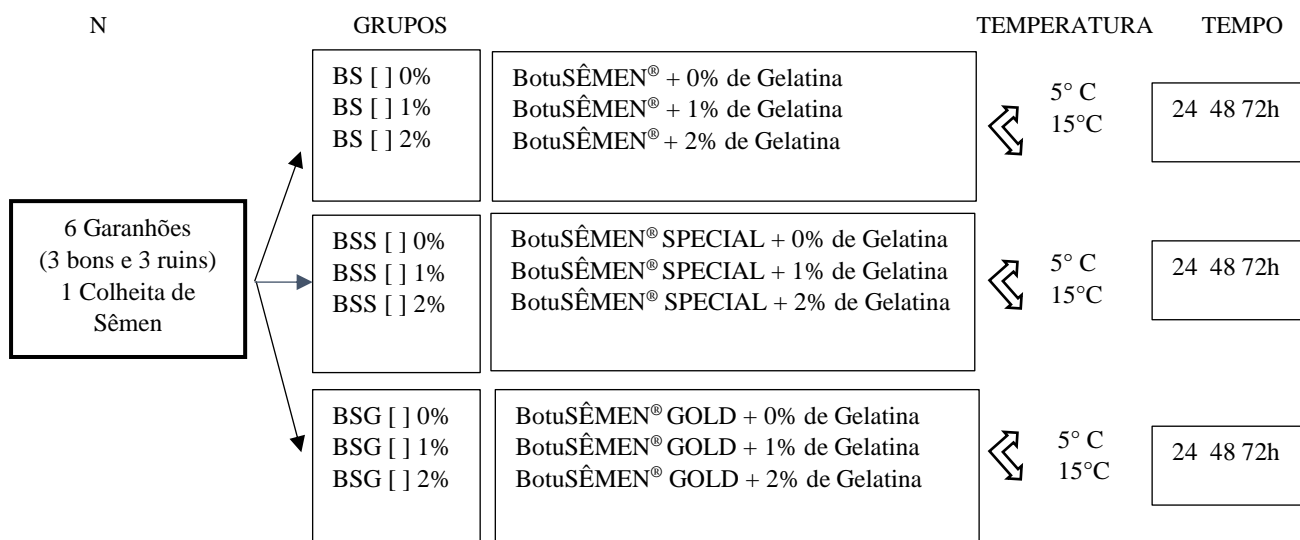


FIGURA 1. Organograma do processamento das amostras no experimento I. O sêmen colhido foi dividido em nove grupos: BS[]0%, BS[]1%, BS[]2% BotuSÊMEN® (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0, 1 e 2% de gelatina, BSS[]0%, BSS[]1%, BSS[]2% BotuSÊMEN® SPECIAL (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0, 1 e 2% de gelatina, e BSG[]0%, BSG[]1%, BSG[]2% BotuSÊMEN® GOLD (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil) com adição de 0, 1 e 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.

2.2 EXPERIMENTO II: Efeito da refrigeração, a 5 °C, de sêmen equino com adição de 2% de gelatina ao diluente BotuSÊMEN® GOLD



FIGURA 2. 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 e 2% de gelatina. As amostras foram armazenadas a 5°C, e avaliadas nos momentos 24, 48 e 72 horas de armazenamento.

2.3 Animais e local da pesquisa

Para este estudo foram utilizados 6 garanhões para o experimento I, (figura 1) e 20 garanhões para o experimento II (figura 2), com idades entre 4 a 20 anos, bom score corporal, sadios, os quais estavam em regime intensivo de criação, no qual era disponível água e suplementação mineral *ad libitum*. Os animais estavam mantidos em propriedades nas cidades de Botucatu-SP, Orlândia-SP e Lucianópolis-SP. Esses garanhões, previamente ao experimento, foram submetidos ao exame andrológico e exame complementar, descartando a existência de qualquer patologia ligada ao aparelho reprodutivo.

Os animais foram classificados em dois grupos, sendo um de alta capacidade de refrigeração ($80\% \geq$ de motilidade total após 24 horas de refrigeração) e outro de baixa capacidade de refrigeração ($60\% \leq$ de motilidade total após 24 horas de refrigeração), essa classificação foi adaptada de Hartwig et al. (2014).

2.4 Colheita e análise do sêmen

A fim de realizar o esgotamento do reservatório espermático, a colheita seminal de cada garanhão foi realizada uma vez a cada 48 horas e por um período de sete dias. Todas as colheitas foram realizadas utilizando manequim e vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil).

Logo após a colheita, foi retirada a fração gelatinosa do ejaculado com a utilização de um filtro de nylon, posteriormente o volume seminal foi mensurado com a observação da graduação do becker em que foi colocado. O cálculo da concentração foi feito com $10\mu\text{L}$ de sêmen em $190\mu\text{L}$ de água destilada (diluição 1:20) e os lados da câmara de Neubauer, espelhada, foram preenchidos com $10\mu\text{L}$ da diluição. A contagem dos lados foi realizada

com microscópio de contraste de fase (Jenamed 2 Zeiss, CarlZeiss®, Munique, Alemanha) com ampliação de 200x.

2.5 Refrigeração e avaliação espermática

As amostras foram analisadas e preparadas no Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal (CERAN), localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Botucatu/SP.

2.5.1 Refrigeração

O ejaculado, in natura, foi diluído nos grupos predeterminados, para concentração final de 50×10^6 espermatozoides/mL (sptz/mL), condicionados em caixa BotuFLEX® por 24h, para fazer a curva de refrigeração adequada, após esse período as amostras foram transferidas para geladeiras Minitube® nas temperaturas de 5 e 15°C, experimento I, e 5°C experimento II.

2.5.2 Cinética espermática

Os parâmetros de cinética foram avaliados pelo Computer Assisted Semen Analysis, através do sistema HTR-IVOS-10 (Hamilton Thorne Research – Animal Version 12,0 L, EUA), configurado no setup de equinos como descritas em estudos anteriores (GUASTI et al., 2013)

Foram analisadas, nos tempos 10 minutos e 60 minutos pós-refrigeração, as seguintes variáveis a nível de porcentagem (%): motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade em linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), movimento lateral de cabeça (ALH), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e número de espermatozoides rápidos (RAP).

2.5.3 Integridade das membranas plasmática acrossomal, estabilidade de membrana, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica.

Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm (FITC, YOPRO e C11-BODYPY) e 695/40nm (Iodeto de propídio); vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20 nm (MitoStatus Red); e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50 nm (Hoechst). No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados serão avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1.

As amostras foram diluídas em TALP-PVA, segundo Parrish et al. (1988) modificado: 100 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 25,0 mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM CaCl₂, 0,4 mM MgCl₂, 10,0 mM HEPES-livre de ácido, 1,0 mM piruvato de sódio, 1,0 mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 µg/mL gentamicina) na concentração de 5×10^6 espermatozoide/mL, suplementado com Hoescht 33342 (7µM; 145333, Sigma) para a eliminação dos detritos.

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossômica, foi utilizada a associação de iodeto de propídio (IP) e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína), de acordo com Freitas-Dell'Aqua (2012). Assim, em uma amostra de 200 µL de sêmen diluído serão adicionados 1,5 µM de IP e 2 ng de FITC-PSA. As amostras serão incubadas durante 15 min a 37 °C, ao abrigo da luz.

Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial na matriz mitocondrial, foi utilizada a associação de YOPRO (YP; marcação para célula com membrana plasmática desestabilizada) e MitoStatus Red (MST; potencial mitocondrial) de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. (2018). Assim, em uma amostra de 500 µL de sêmen diluído serão adicionados 25 nM YP e 20 µM de MST, seguido por incubação a 37°C por 20 minutos.

Para a peroxidação lipídica, foi utilizado protocolo de acordo com Guasti et al. (2012), utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Assim, em 500 µL de sêmen diluído em TALP-PVA foram adicionados 5 µM de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 45 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos, com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300 µl de TALP-PVA.

2.6 Análise estatística

No experimento I foi realizada análise de variância para comparação dos nove grupos (três diluentes e três concentrações de gelatina). Para os parâmetros MT, MP, VAP, VSL, VCL e RAP ($p < 0,05$). Quando houve diferença estatística significativa foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias. Essas análises foram realizadas separadamente por temperatura de refrigeração (5°C e 15°C), tempo de armazenamento (24h, 48h e 72h), e momentos de aquecimento (10 e 60 minutos). O programa utilizado foi o Sigma Stat 3.5. Já no experimento II os dados paramétricos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, foi utilizado o software GraphPad Prism® v9.4.1 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

3 Resultados

3.1 EXPERIMENTO I: Comparação entre diferentes concentrações de gelatina, temperaturas 5 e 15 °C, diluentes, e classificação de garantões

Observamos que houve aumento, crescente, da cinética espermática nos grupos com BS, BSS e BSG, respectivamente, tanto na refrigeração a temperatura de 5°C e 15°C. No

entanto, esse aumento torna-se mais evidente após 48h e 72h de armazenamento, tabela 1 e 2. Essa tendência foi percebida tanto no grupo com ganhões bons quanto nos maus refrigeradores, apesar dos últimos apresentarem maior desvio padrão.

Como esperado, observamos um decréscimo nos valores de MT, MP e RAP nas amostras armazenadas, com o decorrer do tempo, independente da base do diluente (BS, BSS, ou BSG) porcentagem de adição de gelatina (0, 1 ou 2%), das temperaturas de refrigeração (5°C ou 15°C), e categoria do ganhão (bons ou maus refrigeradores de sêmen).

A adição de 1% ou 2% de gelatina, aos meios de refrigeração de sêmen, foi eficaz em mudar o estado físico, de líquido para sólido, do material armazenado durante a refrigeração independente das temperaturas utilizadas, 5°C ou 15°C, sendo totalmente revertido, após o aquecimento a 37°C até 10 minutos. No entanto, na concentração de 1% a liquefação do meio ocorreu mais rápido do que a 2%.



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%.

Os grupos com 0% de gelatina apresentaram precipitação dos espermatozoides no fundo do tubo já no tempo de 24h permanecendo até 72h. A adição da gelatina, nas

concentrações 1% e 2%, mantiveram o meio homogêneo não sendo observado essa precipitação independente do tempo armazenado (figura 3).

Não encontramos diferença estatística nos grupos com adição de gelatina independente da porcentagem utilizada, 1% e 2%, nos tempos avaliados 24, 48 e 72h, das temperaturas de armazenamento, 5°C e 15°C, e entre as categorias de bons ou maus refrigeradores. Porém, foi observado aumento na cinética dos grupos 1% e 2% na categoria de maus refrigeradores nos tempos 48h e 72h como observado nas tabelas 3 e 4.

Houve aumento em MT, MP e RAP, quando a refrigeração foi feita a 5°C em relação a 15°C, principalmente nos tempos de 48h e 72h. Essa melhora foi independente do estado físico do meio e da categoria dos garanhões.

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).

	24 horas		48 horas		72 horas	
	10 min	60 min	10 min	60 min	10 min	60 min
Motilidade Total (%)						
BS []0%	79,7 ± 10,4	79,0 ± 15,9	64,7 ± 29,2	55,7 ± 15,0	38,7 ± 33,6	40,0 ± 29,8
BS []1%	80,3 ± 15,0	67,3 ± 27,6	62,0 ± 32,9	55,3 ± 19,3	49,0 ± 36,9	43,7 ± 34,5
BS []2%	80,3 ± 17,2	68,0 ± 22,5	63,0 ± 35,6	53,3 ± 22,3	50,3 ± 39,6	37,7 ± 37,0
BSS []0%	79,3 ± 6,4	78,0 ± 9,5	56,3 ± 45,6	48,7 ± 41,0	37,7 ± 34,6	46,7 ± 16,0
BSS []1%	71,3 ± 34,9	62,3 ± 41,9	64,3 ± 29,8	66,6 ± 18,9	50,7 ± 37,8	43,0 ± 30,1
BSS []2%	82,7 ± 6,6	76,7 ± 14,5	76,3 ± 14,4	60,7 ± 11,6	46,3 ± 36,5	40,0 ± 34,7
BSG []0%	80,7 ± 3,2	83,7 ± 3,5	78,7 ± 11,0	84,7 ± 5,1	76,3 ± 16,5	81,0 ± 2,6
BSG []1%	85,3 ± 4,6	82,3 ± 7,7	70,3 ± 29,7	77,7 ± 4,6	63,0 ± 19,7	74,0 ± 14,0
BSG []2%	83,3 ± 15,0	81,3 ± 12,2	82,0 ± 12,1	80,7 ± 2,9	68,3 ± 25,4	73,7 ± 24,8
P	0,971	0,899	0,864	0,255	0,668	0,330
Motilidade Progressiva (%)						
BS []0%	30,7 ± 7,1	41,3 ± 5,0	26,7 ± 14,5	33,7 ± 15,3	13,7 ± 11,8	21,3 ± 18,3
BS []1%	42,3 ± 9,4	35,3 ± 14,3	32,7 ± 25,5	30,7 ± 11,0	23,7 ± 19,7	25,0 ± 24,2
BS []2%	43,7 ± 10,4	33,3 ± 13,0	27,3 ± 18,7	26,3 ± 9,1	24,7 ± 21,5	19,3 ± 21,8
BSS []0%	37,7 ± 6,0	43,7 ± 2,0	26,7 ± 22,3	30,3 ± 25,7	12,3 ± 13,3	29,7 ± 5,0
BSS []1%	35,7 ± 25,9	35,3 ± 25,5	32,7 ± 21,2	40,0 ± 6,6	23,7 ± 21,1	26,7 ± 20,3
BSS []2%	49,3 ± 4,2	43,0 ± 5,3	39,3 ± 20,1	32,0 ± 12,1	24,0 ± 23,0	26,3 ± 23,3
BSG []0%	37,0 ± 1,7	38,3 ± 6,3	31,0 ± 8,7	43,3 ± 13,0	26,7 ± 12,1	48,3 ± 6,5
BSG []1%	47,0 ± 8,7	40,7 ± 5,8	34,3 ± 21,7	41,0 ± 10,4	31,7 ± 13,7	40,7 ± 9,6
BSG []2%	45,7 ± 7,3	44,0 ± 13,1	44,0 ± 7,9	42,3 ± 11,2	36,0 ± 20,1	32,7 ± 16,5
P	0,249	0,945	0,703	0,670	0,819	0,552
Espermatozoides Rápidos (%)						
BS []0%	72,3 ± 10,0	68,7 ± 18,3	57,7 ± 29,2	46,0 ± 18,0	31,7 ± 26,5	33,3 ± 29,1
BS []1%	72,0 ± 15,6	57,3 ± 27,8	51,3 ± 36,7	43,3 ± 19,4	39,7 ± 34,2	17,0 ± 17,3
BS []2%	69,0 ± 22,3	54,7 ± 27,8	52,3 ± 35,1	41,7 ± 17,1	39,7 ± 33,5	30,0 ± 32,2
BSS []0%	71,0 ± 12,5	67,7 ± 10,2	49,7 ± 42,9	42,7 ± 35,6	32,0 ± 33,9	37,0 ± 9,9
BSS []1%	96,0 ± 17,4	55,0 ± 41,7	53,3 ± 31,5	58,0 ± 15,7	38,7 ± 31,4	36,7 ± 26,0
BSS []2%	72,3 ± 11,0	65,7 ± 15,3	61,0 ± 28,0	44,3 ± 12,0	35,7 ± 32,0	34,3 ± 32,1
BSG []0%	71,3 ± 2,1	78,0 ± 4,3	70,3 ± 13,6	78,0 ± 7,2	67,7 ± 20,2	74,0 ± 6,1
BSG []1%	77,7 ± 6,8	74,3 ± 9,2	60,0 ± 33,9	69,7 ± 10,0	52,7 ± 18,9	64,7 ± 17,2
BSG []2%	75,3 ± 15,0	72,7 ± 15,6	72,3 ± 14,8	70,7 ± 5,7	56,3 ± 30,6	62,3 ± 31,5
P	0,428	0,865	0,890	0,110	0,646	0,135

BS[]0%, BS[]1%, BS[]2%, BSS[]0%, BSS[]1%, BSS[]2%, BSG[]0%, BSG[]1%, BSG[]2%, referem-se a BS BotuSÊMEN®; BSS BotuSÊMEN® SPECIAL; BSG BotuSÊMEN® GOLD e as ‘[]’ seguidas das numerações simbolizam as concentrações em porcentagem de gelatina utilizada.

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).

	24 horas		48 horas		72 horas	
	10 min	60 min	10 min	60 min	10 min	60 min
BS []0%	81,0 ± 8,0	76,7 ± 5,8 ^{ab}	72,0 ± 8,7	39,0 ± 19,1 ^{abc}	31,0 ± 19,7	14,7 ± 10,0 ^{cd}
BS []1%	76,0 ± 18,2	54,7 ± 13,6 ^b	50,0 ± 31,1	17,0 ± 14,2 ^c	22,3 ± 23,2	6,0 ± 6,2 ^d
BS []2%	55,0 ± 40,4	67,7 ± 10,6 ^{ab}	67,3 ± 16,9	21,3 ± 18,1 ^{bc}	37,0 ± 13,0	7,0 ± 5,2 ^d
BSS []0%	83,0 ± 5,6	72,0 ± 15,4 ^{ab}	75,0 ± 8,2	56,3 ± 7,6 ^{abc}	43,7 ± 31,9	40,7 ± 24,8 ^{abcd}
BSS []1%	83,0 ± 0,0	75,3 ± 9,2 ^{ab}	63,0 ± 14,8	39,7 ± 23,0 ^{abc}	44,3 ± 9,2	26,3 ± 8,5 ^{bcd}
BSS []2%	73,0 ± 19,1	79,0 ± 0,0 ^{ab}	53,3 ± 44,8	46,5 ± 36,1 ^{abc}	42,3 ± 37,4	38,0 ± 1,4 ^{abcd}
BSG []0%	84,0 ± 5,3	81,0 ± 7,5 ^{ab}	82,0 ± 4,0	85,3 ± 3,5 ^a	80,7 ± 6,7	69,3 ± 18,1 ^a
BSG []1%	87,3 ± 4,7	85,7 ± 5,8 ^a	81,3 ± 13,2	75,3 ± 14,6 ^a	74,3 ± 7,0	60,0 ± 7,8 ^{ab}
BSG []2%	85,3 ± 5,8	80,3 ± 3,5 ^{ab}	83,0 ± 4,2	70,7 ± 21,4 ^{ab}	65,0 ± 20,0	51,3 ± 23,3 ^{abc}
P	0,734	0,035	0,053	0,002	0,043	0,009
Motilidade Progressiva (%)						
BS []0%	27,7 ± 6,6	42,3 ± 6,4	21,7 ± 3,0	21,0 ± 13,0	10,3 ± 8,7	7,7 ± 6,5 ^b
BS []1%	35,0 ± 12,2	30,3 ± 2,1	20,3 ± 17,9	7,7 ± 5,7	9,7 ± 14,2	4,0 ± 5,3 ^b
BS []2%	37,3 ± 10,0	33,0 ± 4,6	29,0 ± 10,4	9,0 ± 9,5	14,3 ± 9,1	3,0 ± 3,6 ^b
BSS []0%	29,0 ± 6,5	41,7 ± 10,2	26,3 ± 3,0	32,7 ± 5,8	17,3 ± 15,6	24,7 ± 16,4 ^{ab}
BSS []1%	44,0 ± 10,0	46,0 ± 8,0	29,7 ± 5,0	21,3 ± 7,6	21,7 ± 10,7	12,3 ± 2,5 ^{ab}
BSS []2%	32,3 ± 4,0	33,5 ± 2,1	20,0 ± 20,5	18,5 ± 17,7	13,0 ± 15,4	10,5 ± 0,7 ^{ab}
BSG []0%	33,7 ± 3,0	37,3 ± 4,2	33,3 ± 5,7	34,7 ± 8,1	38,7 ± 13,4	31,0 ± 4,3 ^a
BSG []1%	44,7 ± 6,6	40,7 ± 8,0	41,0 ± 11,5	32,0 ± 9,6	34,7 ± 10,6	32,3 ± 9,9 ^a
BSG []2%	39,7 ± 7,1	37,0 ± 4,3	38,5 ± 0,7	26,3 ± 10,1	26,7 ± 9,8	20,7 ± 8,5 ^{ab}
P	0,149	0,126	0,327	0,025	0,074	0,001
Espermatozoides Rápidos (%)						
BS []0%	71,0 ± 11,0	68,3 ± 4,5 ^{ab}	63,3 ± 12,4	32,0 ± 16,5 ^{bc}	28,7 ± 15,6 ^{ab}	11,7 ± 7,5 ^{bc}
BS []1%	64,3 ± 21,1	43,3 ± 8,1 ^b	38,7 ± 24,1	11,7 ± 7,4 ^c	15,3 ± 18,6 ^{ab}	5,0 ± 6,2 ^c
BS []2%	71,0 ± 15,7	56,7 ± 14,6 ^{ab}	58,0 ± 20,1	13,3 ± 12,0 ^c	27,0 ± 10,1 ^b	5,0 ± 4,3 ^c
BSS []0%	72,0 ± 3,6	65,0 ± 15,0 ^{ab}	65,0 ± 9,0	46,0 ± 4,6 ^{abc}	35,7 ± 29,6 ^{ab}	35,7 ± 21,8 ^{abc}
BSS []1%	76,0 ± 4,3	68,0 ± 9,6 ^{ab}	51,3 ± 10,6	30,7 ± 18,8 ^{bc}	33,7 ± 11,0 ^{ab}	21,0 ± 7,0 ^{bc}
BSS []2%	65,0 ± 20,1	66,5 ± 9,2 ^{ab}	47,0 ± 39,0	35,5 ± 27,6 ^{abc}	30,7 ± 29,1 ^{ab}	22,5 ± 0,7 ^{abc}
BSG []0%	78,0 ± 6,2	74,3 ± 8,5 ^a	74,3 ± 4,0	77,3 ± 4,0 ^a	71,7 ± 4,0 ^a	62,0 ± 19,7 ^a
BSG []1%	79,0 ± 6,1	80,0 ± 6,2 ^a	74,0 ± 4,3	65,3 ± 14,2 ^{ab}	65,0 ± 6,9 ^{ab}	49,7 ± 8,1 ^{ab}
BSG []2%	79,0 ± 7,0	72,3 ± 5,7 ^a	75,7 ± 6,1	60,7 ± 22,2 ^{ab}	50,3 ± 16,9 ^{ab}	43,3 ± 19,7 ^{ab}
P	0,747	0,012	0,197	0,001	0,018	0,001

*Médias seguidas por letra minúscula na coluna representaram diferenças estatísticas significativas (P>0,05) pelo Teste de Tukey. Onde, BS[]0%, BS[]1%, BS[]2%, BSS[]0%, BSS[]1%, BSS[]2%, BSG[]0%, BSG[]1%, BSG[]2%, referem-se a BS BotuSÊMEN®; BSS BotuSÊMEN® SPECIAL; BSG BotuSÊMEN® GOLD e as ‘[]’ seguidas das numerações simbolizam as concentrações em porcentagem de gelatina utilizada.

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).

	24 horas		48 horas		72 horas	
	10 min	60 min	10 min	60 min	10 min	60 min
BS []0%	36,0 ± 31,6	54,7 ± 25,3	25,7 ± 33,1	31,0 ± 20,0	10,7 ± 13,6	30,0 ± 28,2
BS []1%	56,0 ± 42,5	50,0 ± 21,2	28,0 ± 30,2	30,7 ± 22,4	20,0 ± 19,5	21,0 ± 21,1
BS []2%	50,0 ± 29,9	51,3 ± 15,9	36,3 ± 38,1	27,0 ± 23,1	19,7 ± 16,4	12,3 ± 6,7
BSS []0%	45,0 ± 36,0	56,7 ± 24,6	34,7 ± 33,6	39,3 ± 27,7	21,7 ± 28,5	29,3 ± 28,6
BSS []1%	50,0 ± 39,9	41,3 ± 9,4	37,3 ± 36,1	44,3 ± 25,1	20,0 ± 23,6	21,7 ± 17,9
BSS []2%	56,0 ± 38,4	52,7 ± 15,0	43,3 ± 38,8	42,3 ± 24,7	39,0 ± 39,6	24,7 ± 20,5
BSG []0%	50,0 ± 36,5	55,3 ± 15,6	33,7 ± 31,3	48,7 ± 25,8	22,7 ± 21,6	33,3 ± 33,7
BSG []1%	43,3 ± 30,9	53,7 ± 8,0	33,0 ± 34,6	39,0 ± 25,5	28,0 ± 24,9	38,3 ± 24,9
BSG []2%	66,0 ± 19,0	60,7 ± 3,0	40,0 ± 39,5	47,3 ± 26,3	38,3 ± 28,5	40,6 ± 21,5
P	0,993	0,957	1,000	0,958	0,927	0,887
Motilidade Progressiva (%)						
BS []0%	14,3 ± 12,5	26,0 ± 11,3	12,3 ± 18,0	16,3 ± 11,7	4,3 ± 6,6	14,0 ± 13,5
BS []1%	22,3 ± 18,6	22,0 ± 7,0	13,3 ± 13,0	14,3 ± 9,8	8,7 ± 8,5	8,7 ± 9,0
BS []2%	22,7 ± 14,4	20,0 ± 9,6	12,7 ± 12,5	9,7 ± 8,5	6,3 ± 5,5	6,3 ± 5,9
BSS []0%	19,0 ± 17,0	26,3 ± 11,0	16,3 ± 17,0	20,0 ± 15,5	9,3 ± 12,8	15,0 ± 15,1
BSS []1%	22,7 ± 20,0	18,7 ± 4,7	16,0 ± 16,0	23,7 ± 13,0	8,3 ± 9,1	10,7 ± 8,5
BSS []2%	24,0 ± 17,8	20,7 ± 4,9	16,0 ± 13,9	16,3 ± 9,1	16,7 ± 18,1	7,3 ± 4,5
BSG []0%	19,0 ± 17,3	19,0 ± 9,8	9,3 ± 8,6	18,7 ± 13,4	6,0 ± 5,5	15,7 ± 21,1
BSG []1%	21,0 ± 15,6	21,3 ± 8,1	13,3 ± 15,9	15,0 ± 14,7	10,0 ± 7,9	17,7 ± 13,2
BSG []2%	30,7 ± 12,7	24,0 ± 12,1	14,7 ± 15,0	18,3 ± 10,7	14,0 ± 15,1	15,3 ± 11,9
P	0,983	0,959	1,000	0,949	0,909	0,942
Espermatozoides Rápidos (%)						
BS []0%	30,0 ± 26,4	43,7 ± 19,7	20,7 ± 29,1	23,7 ± 16,2	8,0 ± 11,4	20,3 ± 18,8
BS []1%	43,0 ± 35,8	35,0 ± 16,5	22,7 ± 23,0	19,0 ± 13,8	14,0 ± 13,5	12,7 ± 13,0
BS []2%	41,7 ± 27,6	33,3 ± 18,0	28,0 ± 30,2	15,7 ± 13,6	12,3 ± 10,3	8,0 ± 6,1
BSS []0%	35,3 ± 31,2	46,7 ± 20,2	29,0 ± 30,0	30,7 ± 21,5	19,0 ± 24,8	22,3 ± 22,0
BSS []1%	38,7 ± 36,7	28,3 ± 7,6	29,7 ± 31,1	33,3 ± 20,0	13,3 ± 14,6	13,0 ± 10,4
BSS []2%	47,3 ± 35,8	34,7 ± 9,1	35,0 ± 32,4	29,7 ± 19,3	30,7 ± 32,6	12,0 ± 7,5
BSG []0%	37,7 ± 32,7	41,3 ± 18,8	25,7 ± 26,5	35,0 ± 22,1	18,7 ± 17,6	25,7 ± 32,4
BSG []1%	38,0 ± 25,7	40,3 ± 14,2	25,3 ± 27,1	27,0 ± 22,1	19,7 ± 16,4	25,3 ± 20,2
BSG []2%	55,7 ± 16,4	42,3 ± 18,2	28,3 ± 28,0	32,3 ± 20,0	27,3 ± 29,0	25,3 ± 17,0
P	0,991	0,915	1,000	0,924	0,917	0,886

BS[]0%, BS[]1%, BS[]2%, BSS[]0%, BSS[]1%, BSS[]2%, BSG[]0%, BSG[]1%, BSG[]2%, referem-se a BS BotuSÊMEN®; BSS BotuSÊMEN® SPECIAL; BSG BotuSÊMEN® GOLD e as ‘[]’ seguidas das numerações simbolizam as concentrações em porcentagem de gelatina utilizada.

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).

	24 horas		48 horas		72 horas	
	10 min	60 min	10 min	60 min	10 min	60 min
BS []0%	19,7 ± 17,0 ^c	42,0 ± 25,5	43,7 ± 39,5	34,7 ± 26,7	26,7 ± 40,3	26,3 ± 19,1
BS []1%	26,7 ± 18,4 ^{bc}	33,7 ± 17,2	53,3 ± 28,0	28,7 ± 16,5	31,3 ± 22,0	19,0 ± 15,1
BS []2%	42,0 ± 15,0 ^{abc}	36,7 ± 10,1	50,7 ± 22,5	17,7 ± 5,9	36,7 ± 18,1	13,3 ± 10,9
BSS []0%	18,7 ± 15,0 ^c	39,7 ± 11,0	35,3 ± 34,9	39,0 ± 21,7	25,3 ± 33,1	29,0 ± 24,8
BSS []1%	17,0 ± 12,0 ^{abc}	48,7 ± 15,1	51,3 ± 29,0	27,0 ± 9,2	40,3 ± 27,2	22,0 ± 12,8
BSS []2%	56,3 ± 14,0 ^a	56,0 ± 21,1	58,0 ± 17,3	48,7 ± 8,0	41,7 ± 19,9	18,3 ± 11,5
BSG []0%	31,7 ± 15,5 ^{abc}	63,7 ± 4,5	48,7 ± 24,1	52,7 ± 18,2	26,3 ± 23,6	35,0 ± 11,5
BSG []1%	48,0 ± 4,4 ^{ab}	67,0 ± 7,8	60,0 ± 6,0	43,3 ± 3,2	38,7 ± 23,0	21,0 ± 5,7
BSG []2%	49,3 ± 1,1 ^{ab}	47,7 ± 7,2	62,3 ± 9,1	42,7 ± 19,5	44,7 ± 23,2	27,0 ± 19,1
P	0,029	0,124	0,946	0,247	0,979	0,814
Motilidade Progressiva (%)						
BS []0%	7,0 ± 8,7	16,3 ± 14,7	16,3 ± 19,5	16,7 ± 15,0	8,7 ± 14,1	11,3 ± 11,1
BS []1%	9,3 ± 7,8	14,3 ± 10,1	19,3 ± 11,7	10,0 ± 6,6	8,3 ± 7,2	5,0 ± 4,6
BS []2%	10,7 ± 1,5	12,3 ± 6,4	16,3 ± 8,3	6,3 ± 4,2	7,7 ± 6,7	3,7 ± 4,6
BSS []0%	6,3 ± 7,6	14,0 ± 5,3	12,7 ± 16,8	18,3 ± 14,6	8,7 ± 13,3	16,7 ± 16,5
BSS []1%	12,0 ± 7,0	19,7 ± 8,5	18,0 ± 11,8	9,7 ± 0,6	16,0 ± 13,2	5,3 ± 4,0
BSS []2%	17,0 ± 4,4	23,7 ± 12,2	21,3 ± 6,0	14,7 ± 0,6	11,0 ± 5,3	3,7 ± 2,3
BSG []0%	7,0 ± 3,5	23,3 ± 4,2	11,7 ± 7,1	19,7 ± 9,0	5,3 ± 6,1	10,0 ± 6,6
BSG []1%	17,3 ± 7,2	25,0 ± 4,6	19,7 ± 7,0	15,3 ± 0,6	12,0 ± 8,2	7,0 ± 2,6
BSG []2%	16,7 ± 2,1	18,7 ± 5,9	18,0 ± 15,5	12,7 ± 2,9	11,7 ± 4,9	7,0 ± 5,2
P	0,176	0,565	0,987	0,546	0,946	0,526
Espermatozoides Rápidos (%)						
BS []0%	15,7 ± 14,4	33,7 ± 24,9	36,7 ± 36,0	29,3 ± 22,2	24,7 ± 38,5	21,7 ± 17,0
BS []1%	19,0 ± 13,4	24,3 ± 13,3	44,3 ± 24,0	19,0 ± 10,0	21,3 ± 16,1	13,7 ± 10,5
BS []2%	27,0 ± 4,4	24,0 ± 6,2	35,7 ± 13,6	10,7 ± 5,0	24,0 ± 14,9	7,7 ± 7,4
BSS []0%	11,7 ± 11,7	32,3 ± 10,2	28,0 ± 31,7	30,7 ± 18,8	22,0 ± 28,2	25,0 ± 21,4
BSS []1%	27,7 ± 9,5	36,3 ± 12,6	41,0 ± 23,8	17,0 ± 4,4	31,3 ± 22,4	14,0 ± 6,2
BSS []2%	42,0 ± 11,5	42,6 ± 18,0	46,0 ± 14,2	33,3 ± 5,7	29,7 ± 11,9	7,3 ± 1,1
BSG []0%	54,0 ± 65,8	52,3 ± 3,2	36,7 ± 18,3	44,3 ± 19,0	20,3 ± 19,6	27,0 ± 13,1
BSG []1%	34,3 ± 3,2	56,0 ± 5,3	47,7 ± 7,2	32,3 ± 6,1	28,7 ± 16,7	15,0 ± 4,4
BSG []2%	35,0 ± 3,5	33,0 ± 4,6	47,7 ± 15,0	29,0 ± 9,8	30,0 ± 15,6	18,7 ± 12,0
P	0,504	0,069	0,968	0,138	0,998	0,451

*Médias seguidas por letra minúscula na coluna representaram diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) pelo Teste de Tukey. Onde BS[]0%, BS[]1%, BS[]2%, BSS[]0%, BSS[]1%, BSS[]2%, BSG[]0%, BSG[]1%, BSG[]2%, referem-se a BS BotuSÊMEN®; BSS BotuSÊMEN® SPECIAL; BSG BotuSÊMEN® GOLD e as “[]” seguidas das numerações simbolizam as concentrações em porcentagem de gelatina utilizada.

3.2 EXPERIMENTO II: Efeito da refrigeração, a 5 °C, de sêmen equino com adição de 2% de gelatina ao diluente BotuSEMEN® GOLD

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.

	T24		T48		T72	
	BSG [0%]	BSG [2%]	BSG [0%]	BSG [2%]	BSG [0%]	BSG [2%]
MT	76,1 ± 4,3	73,5 ± 4,3	70,5 ± 5,3	60,3 ± 5,8	55,2 ± 6,6	46,5 ± 7,0
MP	38,1 ± 2,8	39,7 ± 2,9	37,2 ± 3,5	31,7 ± 3,4	31,2 ± 4,1	22,6 ± 3,6
STR	76,7 ± 1,2	79,6 ± 1,1	78,8 ± 0,9	80,8 ± 1,2	82,3 ± 1,0	80,3 ± 1,0
LIN	44,4 ± 1,1	45,5 ± 0,9	44,7 ± 1,1	45,6 ± 1,2	44,5 ± 1,3	41,9 ± 1,9
RAP	68,5 ± 4,3	63,0 ± 4,5	61,8 ± 5,1	50,2 ± 5,4	42,7 ± 5,8	37,2 ± 6,1
VAP	118 ± 3,2 ^a	99,8 ± 3,3 ^b	109,8 ± 4,0 ^a	96,3 ± 3,0 ^b	98,4 ± 4,6 ^a	80,4 ± 6,0 ^b
VSL	89,9 ± 2,5 ^a	74,5 ± 4,3 ^b	84,3 ± 3,2 ^a	74,8 ± 2,6 ^b	98,4 ± 4,6 ^a	80,4 ± 6,0 ^b
VCL	218,7 ± 4,6 ^a	183,1 ± 5,1 ^b	205,3 ± 6,5 ^a	182,1 ± 4,5 ^b	189,4 ± 6,7 ^a	161,6 ± 10,5 ^b
ALH	6,4 ± 0,5	5,2 ± 0,7	7,4 ± 0,2 ^a	6,7 ± 0,2 ^b	6,4 ± 0,5	5,2 ± 0,7

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) BSG [0%] (BotuSEMEN® GOLD); BSG [2%] (BotuSEMEN® GOLD + 2% gelatina). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; RAP: espermatozoides com movimento rápido; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvilínea; ALH: movimento lateral de cabeça.

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.

	MPA		PER		STABLE		HPM	
	BSG [0%]	BSG [2%]	BSG [0%]	BSG [2%]	BSG [0%]	BSG [2%]	BSG [0%]	BSG [2%]
T24	66,2 ± 3,6	63,6 ± 4,1	369 ± 43,19	393 ± 45,69	67,5 ± 3,7 a	64,3 ± 3,9b	59,3 ± 4,4	58,0 ± 4,1
T48	63,2 ± 4,5	58,2 ± 4,7	438,9 ± 35,47	444 ± 39,57	63,3 ± 4,6 a	57,6 ± 4,6 b	54,7 ± 4,5 a	50,1 ± 4,3 b
T72	50,2 ± 4,3	45,9 ± 4,2	454,9 ± 40,02	459 ± 36,48	46,6 ± 4,2 a	43,1 ± 4,1b	41,3 ± 3,7 a	38,0 ± 3,4b

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$) BSG [0%] (BotuSEMEN® GOLD); BSG [2%] (BotuSEMEN® GOLD + 2% gelatina). MPA: integridade de membrana plasmática acrossomal, PER: peroxidação lipídica, STABLE (célula YOPRO negativa): estabilidade da membrana plasmática, HPM: células com alto potencial mitocondrial.

Os resultados obtidos no experimento II mostram que para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal (MPA), não houve diferença entre os tratamentos, assim como a peroxidação lipídica. Mas a gelatina alterou a permeabilidade de membrana e diminuiu o potencial mitocondrial a partir das 48 horas.

4 Discussão

No presente estudo não houve redução dos valores de cinética espermática quando adicionamos 1 ou 2% de gelatina. É interessante observar que a MT, MP e RAP se mantiveram semelhantes nos grupos com e sem a gelatina em todos os momentos avaliados. Esse resultado foi observado também em estudos prévios em garanhões com boa capacidade de refrigeração de sêmen, (SANTOS et al., 2015).

Os resultados mostram uma tendência numérica ao aumento dos valores de cinética em garanhões classificados como mau refrigeradores, parecendo que os benefícios do armazenamento sólido são melhores expressados em animais, que sem o uso de gelatina, apresentam queda drástica da MT, MP e RAP durante a refrigeração. No entanto, acreditamos que devido ao alto desvio padrão desses animais não encontramos diferença estatística.

Nos estudos *in vitro*, resultados semelhantes e até um aumento dos parâmetros de cinética espermática e viabilidade foram encontrados em algumas espécies de mamíferos, com a adição de gelatina ao meio diluente de sêmen, sendo elas: coelho (NAGY et al., 2002), ovinos (YANIZ et al., 2005), caprinos (SALVADOR *et al.*, 2006) e suínos (CORCINI et al., 2011). Corcini et al. (2011) avaliaram o efeito do armazenamento de sêmen suíno em meio sólido, sendo que com a adição de 1,5% de gelatina foi capaz de manter qualidade espermática por até 96h. No entanto nenhum desses estudos comparou o efeito da gelatina no sêmen de animais maus refrigeradores com os bons refrigeradores.

Os valores de MT, MP e RAP, diminuíram durante o tempo de armazenamento foi mais evidente a partir de 48h em todos os tratamentos, semelhante aos resultados de Santos et al., em 2015 na espécie equina, no entanto utilizando o meio Kenney de refrigeração, a adição de gelatina piorou a cinética, enquanto que no presente estudo observou-se que a

adição de gelatina aos meios BS, BSS ou BSG não interferiu negativamente nesses parâmetros.

Observou-se que houve aumento, crescente, da cinética espermática nos grupos com BS, BSS e BSG, respectivamente, tanto na refrigeração a temperatura de 5°C e 15°C. No entanto, esse aumento torna-se mais evidente após 48h e 72h de armazenamento. Essa tendência foi observada tanto no grupo com ganhões bons quanto nos maus refrigeradores, apesar dos últimos apresentarem maior desvio padrão.

Foi visto decréscimo nos valores de MT, MP e RAP nas amostras armazenadas, com o decorrer do tempo, independente da base do diluente (BS, BSS, ou BSG) porcentagem de adição de gelatina (0, 1 e 2%), das temperaturas de refrigeração (5°C e 15°C), e categoria do ganhão (bons ou maus refrigeradores de sêmen).

Os grupos com BSG, independente da concentração de gelatina, mantiveram valores numéricos superiores de cinética espermática em todos os tempos de avaliação e nas duas categorias de animais utilizados, sendo mais visível nos ganhões maus refrigeradores. Este resultado já era esperado devido os constituintes presentes no BSG, sendo principalmente o caseinato de sódio e colesterol como descrito por Novello et al. (2020).

Os maiores valores numéricos presentes nos grupos com BSG podem estar correlacionados diretamente com a presença da caseína, proteína derivada do leite, a qual segundo Manjunath, (2012), tem a capacidade de interagir com proteínas plasmáticas específicas proporcionando melhora na qualidade seminal. Além disso, o estudo conduzido por Campos et al. (2020), obteve resultados positivos com o uso dessa proteína durante a refrigeração por 24h de sêmen equino com a manutenção das características e viabilidade espermática principalmente em ganhões maus refrigeradores.

Foi observado que a cinética espermática, das amostras refrigeradas a 5°C, manteve valores condizentes com a categoria de bons e maus refrigeradores. O que vai de acordo com Pugliesi, (2009), que relata a correlação da manutenção da cinética espermática em temperaturas reduzidas, com a utilização de diluentes compostos por substâncias que são capazes interagir com os espermatozoides proporcionando valores adequados de estabilidade da membrana plasmática e cinética.

Apesar da MT, MP e RAP não apresentarem diferença entre o grupo com e sem gelatina, nos tempos avaliados, as velocidades de trajeto (VAP); linear (VSL) e curvilínea (VCL), foram menores no grupos com gelatina, acredita-se que devido ao aumento da viscosidade pode ter dificultado o movimento da cauda do espermatozoide, diminuindo as velocidades.

O aumento da viscosidade ou a mudança para o estado sólido nos grupos com 1 ou 2% de gelatina aconteceu como o esperado, sendo semelhante aos resultados Corcini et al. (2011), com adição de 1,5% de gelatina ao sêmen de suíno. Reforçando a ideia de que adição nessa concentração pode ser suficiente para transformar o estado físico da dose inseminante diminuindo o refluxo após a inseminação artificial.

Portanto a adição de 1% ou 2% de gelatina, aos meios de refrigeração de sêmen, é eficaz para mudar o estado físico, de líquido para sólido, do material armazenado durante a refrigeração independente das temperaturas utilizadas, 5°C ou 15°C, sendo totalmente revertido, após o aquecimento a 37°C até 10 minutos. No entanto, na concentração de 1% a liquefação do meio ocorreu mais rápido do que a 2%.

A função mitocondrial foi menor no grupo com gelatina, essa diminuição atribuímos a dois efeitos da gelatina, primeiro devido a maior dificuldade do espermatozoide se mover no meio mais viscoso e conseqüente maior demanda energética, e segundo devido a maior

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.; YÁÑIZ, 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.

YÁÑIZ, 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.

