

**VICTOR NETTO MAIA**

**EFEITO DO DILUENTE (BOTU-SÊMEN® E ACP-105®) E DA  
ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES (GLUTATIONA PEROXIDASE E  
CISTEÍNA) NA VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS DE EQUINOS**

**RECIFE**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**VICTOR NETTO MAIA**

**EFEITO DO DILUENTE (BOTU-SÊMEN® E ACP-105®) E DA  
ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES (GLUTATIONA PEROXIDASE E  
CISTEÍNA) NA VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS DE EQUINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra

Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Gustavo Ferrer Carneiro

**RECIFE - PE**

**2010**

## Ficha catalográfica

M217e Maia, Victor Netto  
Efeito do diluente (Botu-sêmen ® e ACP ®) e da adição de antioxidante (glutaciona peroxidase e cisteína) na viabilidade de espermatozoides refrigerado de eqüinos / Victor Netto Maia – 2010.  
61 p. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.  
Referências.

1. Antioxidantes 2. Sêmen 3. Glutaciona peroxidase  
4. Eqüino 5. Cisteína 6. Sêmen refrigerado I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientadora II. Título

CDD 636.08926

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**EFEITO DO DILUENTE (BOTU-SÊMEN® E ACP-105®) E DA  
ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES (GLUTATIONA PEROXIDASE E  
CISTEÍNA) NA VIABILIDADE DE ESPERMATOZOIDES  
REFRIGERADOS DE EQUINOS**

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

**VICTOR NETTO MAIA**

Aprovada em 30 de agosto de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE

Orientadora

Profa. Dra. Érika Christina Santos Oliveira/UFRPE

Prof. Dr. Karen Mascaro Gonçalves da Silva

Dra Zoraide Fernandes Coletto (suplente)

A Deus, a toda minha família e amigos, em especial, meu pai, minha mãe e minha esposa. Todos que formam o ANDROLAB e minha orientadora, a professora Madalena, por terem acreditado, confiado e me ajudado incondicionalmente.

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concedido o dom da vida, a oportunidade e o privilégio do estudo. Pelas inúmeras bênçãos a mim concedidas diariamente e aos vários “anjos” que ELE coloca e colocou junto de mim em toda a minha caminhada;

A toda minha família, em especial, meu pai, Maurício, e minha mãe, Dolores, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para me ajudar a realizar todos os meus sonhos; inclusive, por muitas vezes, abrindo mão de seus próprios sonhos em função dos meus. Aos meus irmãos Daniel e Juliana e aos meus cunhados, que, com toda certeza, estão sempre torcendo por mim;

A Karinna, minha esposa, amiga, companheira e agora mãe de meu mais novo amor: Mariah. Que sempre me deu forças para conseguir ir em frente;

Ao vários professores que contribuíram na minha formação, os quais jamais esquecerei;

Aos meus amigos e sócios no Centro de Equinos de Pernambuco-CEPE, Eduardo Andrade Lima, Oswaldo Gomes Neto, e também ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, pela amizade, confiança, respeito e apoio;

À professora e orientadora, Maria Madalena Pessoa Guerra, com a qual tenho aprendido e me surpreendido, cada vez mais. Além dos conhecimentos científicos, ela tornou-se para mim um exemplo de profissional e de ser humano; capaz de se desprender de si em prol do próximo. Professora: MEU MUITO OBRIGADO!!;

Aos técnicos e funcionários, Alcir, Joana, D<sup>a</sup> Sonia e Marquinhos, pelo carinho e atenção;

Aos companheiros do ANDROLAB: Adriana, Álvaro, Clara, Diogo, Filipe Moraes, Kaline, Lawrence, Lígia, Pedro, Prof.<sup>a</sup> Érica e, em especial, Sildivane, que é meu anjo da guarda; a Ellen que sempre se preocupou em me ajudar; a André Mariano (“O Corrupto”), pela amizade e paciência, e a Felipe Costa, que foi meu parceiro fundamental no experimento. A todos devo minha eterna gratidão;

A todos que formam o Haras Vida Boa, “palco” deste experimento;

À equipe da ACP Biotecnologia, em especial ao professor Dr José Ferreira Nunes e a Cristiane Salgueiro, pelo apoio e fornecimento do ACP-105.

“O caminho no qual a criança siga e conheça em sua infância, nem na velhice o deixará.”

**(D. Helder Câmara)**

**LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

%: Porcentual

CFDA: Diacetato de carboxifluoresceína

CTC: Clortetraciclina

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FITC-PNA: Fluorescein isothiocyanate-conjugated agglutin

GSH: Glutathiona reduzida

GPx: Glutathiona peroxidase

GSSG: Glutathiona oxidada

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

IA: Inseminação artificial

iAC: Integridade do acrossoma

iMP: Integridade de membrana plasmática

JC-1: 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolil-carbocianine iodide

M: Molar

MP: Motilidade progressiva

O<sub>2</sub>: oxigênio molecular

OH<sup>•</sup>: Radical hidroxila

IP: Iodeto de propídeo

PMM: Potencial de membrana mitocondrial

PNA: *Arachis hypogaea agglutinin*

PSA: *Pisum sativum agglutinin*

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Espécies reativas ao oxigênio

SOD: Superóxido dismutase

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1 -</b> Média geral $\pm$ desvio padrão da motilidade total (%) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T <sub>0h</sub> , T <sub>12h</sub> e T <sub>24h</sub> ) e 18 °C (T <sub>36h</sub> ) .....	<b>54</b>
<b>Tabela 2 -</b> Média geral $\pm$ desvio padrão do vigor (0-5) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T <sub>0h</sub> , T <sub>12h</sub> e T <sub>24h</sub> ) e 18 °C (T <sub>36h</sub> ).....	<b>55</b>
<b>Tabela 3 -</b> Média geral $\pm$ desvio padrão da integridade de membrana (%) em espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T <sub>0h</sub> , T <sub>12h</sub> e T <sub>24h</sub> ) e 18 °C (T <sub>36h</sub> ) .....	<b>56</b>
<b>Tabela 4 –</b> Média geral $\pm$ desvio padrão da integridade de acrossomas (%) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T <sub>0h</sub> , T <sub>12h</sub> e T <sub>24h</sub> ) e 18 °C (T <sub>36h</sub> ) .....	<b>57</b>
<b>Tabela 5 –</b> Média geral $\pm$ desvio padrão do potencial de membrana mitocondrial (%) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T <sub>0h</sub> , T <sub>12h</sub> e T <sub>24h</sub> ) e 18 °C (T <sub>36h</sub> ) .....	<b>58</b>
<b>Tabela 6 –</b> Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis do sêmen de eqüinos, antes e após a refrigeração, com e sem adição de substâncias antioxidantes .....	<b>59</b>

Valores médios de motilidade total, vigor, alto porcentual de membrana mitocondrial (aPMM), integridade de membrana (IM) e integridade de acrossoma de espermatozoides equinos, após a refrigeração, com e sem adição de substâncias antioxidantes.....  
 .....  
 .....

Coefficiente de correlação de Pearson entre variáveis do sêmen de equinos, antes e após a refrigeração, com e sem adição de substâncias antioxidantes.....  
 .....

Valores com a média geral e o desvio padrão da motilidade total em função dos tempos avaliados (T0, T12h, T24h e T36h) para cada grupo testado.....  
 .....

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1 -</b> Representações gráficas da análise de regressão, em função dos tempos avaliados, dos parâmetros de motilidade, vigor, integridade de membrana (IM), integridade de acrossoma (IAC) e alto potencial de membrana mitocondrial (APMM) de espermatozoides eqüinos, antes e após a refrigeração, adicionados ou não com diferentes antioxidantes.....	<b>60</b>

## RESUMO

Em eqüinos, o sêmen refrigerado é o mais utilizado nas IAs. Portanto, vários estudos vêm sendo realizados a fim de se obter resultados cada vez melhores da preservação e manutenção da viabilidade das células espermáticas até o momento de sua deposição no trato reprodutivo da fêmea. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito dos diluentes (Botu-Sêmen® e ACP-105®) e da adição dos antioxidantes glutaciona peroxidase e cisteína na viabilidade de espermatozoides equinos refrigerados. Foram utilizados quatro reprodutores da raça Mangalarga Marchador, os quais foram submetidos a colheitas de sêmen com vagina artificial e uma fêmea como manequim. Após colheita, as amostras de sêmen de cada garanhão foram avaliadas e diluídas em Botu-sêmen® ou ACP-105®. A seguir, a fração de cada diluidor foi fracionada para constituir os grupos experimentais: G1 = Botu-Sêmen® (sem antioxidante); G2 = ACP-105® (sem antioxidante); G3 = Botu-Sêmen® + 5U de Glutaciona Peroxidase; G4 = ACP-105® + 5U de Glutaciona Peroxidase; G5 = Botu-Sêmen® + 5mM de Cisteína; G6 = ACP-105® + 5mM de Cisteína; G7 = Botu-Sêmen® + 5U de Glutaciona Peroxidase + 5mM de Cisteína e G8 = ACP-105® + 5U de Glutaciona Peroxidase + 5mM de Cisteína. As amostras de cada grupo experimental foram colocadas, em triplicata, em duas caixas de refrigeração (14 °C) de sêmen do tipo Botutainer®. As amostras de sêmen foram submetidas à avaliação quanto a motilidade total, vigor, integridade de membrana, integridade de acrossoma e potencial da membrana mitocondrial, imediatamente após a chegada ao Laboratório, constituindo o momento zero (T<sub>0</sub>), assim como após 12 (T<sub>12h</sub>), 24 (T<sub>24h</sub>) e 36 horas (T<sub>36h</sub>) de refrigeração a 14 °C.

Palavras-chave: ACP-105®, Botu-Sêmen®, refrigeração, sêmen, equino.

## ABSTRACT

In equine chilled semen is the most used in the IAs. Therefore, several studies have been conducted in order to obtain better results in preserving and maintaining the viability of sperm cells until the time of his deposition in the female reproductive tract. The objective was to study the effect of diluents (Botu-Semen ® and ACP-105 ®) and the addition of the antioxidants cysteine and glutathione peroxidase in the viability of equine spermatozoa cooled. We used four players Mangalarga Marchador, which were subjected to semen collection with an artificial vagina and as a female mannequin. After harvest, samples of semen from each stallion were evaluated and diluted semen-Botu ® or ACP-105 ®. Then, the fraction of each extender was fractionated to form the experimental groups: G1 = Botu ®-Semen (no antioxidant), G2 = ACP-105 ® (without antioxidant), G3 = Botu-Semen ® + 5U of Glutathione Peroxidase; G4 = ACP-105 ® + 5U of Glutathione Peroxidase; = G5-Botu Semen ® + 5mM cysteine G6 = ACP-105 ® + 5mM cysteine; G7 = Botu-Semen ® 5U of Glutathione Peroxidase + + and 5 mM Cysteine G8 = ACP-105 ® + 5U of Glutathione Peroxidase + 5mM cysteine. Samples from each experimental group were placed in triplicate in two boxes of cooling (14 ° C) semen type Botutainer ®. Semen samples were assessed as total motility, vigor, membrane integrity, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential, immediately after arrival at the laboratory, making the time zero (T0) and after 12 (T12h) , 24 (T24h) and 36 hours (T36h) cooled to 14 oC.

**Keyword:** Botu-Sêmen®, ACP-105®, cooling, semen, equine.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1 Espermatozóides</b> .....	16
<b>2.2 Plasma seminal</b> .....	16
<b>2.3 Preservação do sêmen por refrigeração</b> .....	17
<b>2.4 Fatores que afetam a viabilidade do sêmen equino refrigerado</b> .....	18
<b>2.5 Diluente para sêmen</b> .....	19
<b>2.6 Espécies reativas de oxigênio e Antioxidantes</b> .....	21
2.6.1 Glutaciona peroxidase (GPx) .....	22
2.6.2 Cisteína .....	23
<b>2.7 Métodos de avaliação do sêmen equino com sondas fluorescentes</b> .....	24
2.7.1 Diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP) .....	25
2.7.2 Carboxianina fluorescente (JC-1).....	25
2.7.3 Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a <i>Peanut agglutinin</i> (FITC-PNA) .....	26
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28
<b>4 EXPERIMENTO</b> .....	34
<b>4.1 Efeito do diluente e da adição dos antioxidantes glutaciona peroxidase e cisteína na viabilidade de espermatozoides equinos refrigerados</b> .....	35
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	61

# 1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) em eqüinos é uma técnica bastante desenvolvida e vem sendo usada com grande freqüência nesta espécie. Esta biotécnica também é muito utilizada em outras espécies de produção, como bovinos, caprinos, ovinos e animais de companhia, como os caninos. As principais vantagens do seu uso são redução no custo do transporte dos animais que se encontram em diferentes localidades, uso de um ejaculado para mais de uma fêmea e proteção contra as doenças sexualmente transmissíveis. Esta técnica é relativamente simples e implica na obtenção prévia do sêmen, para posterior uso *in natura*, refrigerado ou congelado.

Em eqüinos, o sêmen refrigerado é o mais utilizado nas IAs. Portanto, vários estudos vêm sendo realizados a fim de se obter resultados cada vez melhores quanto à preservação e manutenção da viabilidade das células espermáticas até o momento de sua deposição no trato reprodutivo da fêmea. Como a refrigeração trata-se de um processo de criopreservação, faz-se necessário a adição do diluente ao sêmen, cuja função é aumentar o volume do ejaculado e proteger as células espermáticas dos efeitos deletérios da criopreservação (PEÑA, 2000).

As propriedades protetoras do diluente são atribuídas aos seus diferentes componentes, à interação com as células espermáticas de uma determinada espécie e ao indivíduo (CUNHA e LOPES, 2003). O diluente mais utilizado na espécie equina são aqueles à base de leite desnatado, com disponibilidade comercial de vários produtos.

Com o advento da busca por produtos que não sejam de origem animal, a água de coco tem se mostrado uma boa alternativa, com ação benéfica sobre a conservação celular. Todavia, existem poucos estudos utilizando este diluente em amostras de sêmen na espécie equina. Na apresentação em pó, semelhante aos diluentes convencionais disponíveis no mercado, a água de coco (ACP-105) é obtida por um processo de alta desidratação a vácuo, e proporciona as mesmas vantagens quanto ao transporte e acondicionamento, assim como a praticidade dos diluentes comerciais de origem animal (SOBREIRA NETO, 2008).

Os espermatozóides são células que vivem em ambiente com condições aeróbicas, mas o metabolismo biológico oxidativo das moléculas é potencialmente tóxico devido à formação de espécies reativas do oxigênio, conhecidas como ROS (BOUNHER et al., 2000). As ROS incluem um grande número de moléculas

quimicamente reativas oriundas do oxigênio, como o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $OH^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MAIA, 2003). Além disso, algumas células possuem a capacidade de gerar ROS, como parte de suas funções normais (BOUNHER et al., 2000). No intuito de reduzir os danos causados aos espermatozoides pela formação das ROS, vários estudos vêm sendo realizados avaliando o efeito da administração oral de antioxidantes ou da inclusão dessas substâncias aos diluentes utilizados no sêmen de várias espécies.

Desta forma, objetivou-se com este trabalho avaliar o ACP-105® como diluente para sêmen equino refrigerado, bem como a ação da adição de 5U/ml de glutathione peroxidase (GPx) e 5mM de cisteína (Cist.), isoladas e associadas ao diluente testado tendo como controle um diluente convencional para equinos a base de leite (Botu-Sêmen®).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Espermatozóides**

Os espermatozóides são células reprodutivas masculinas, que se apresentam revestidas por uma membrana plasmática composta por uma dupla camada de lipídios, proteínas e carboidratos (AMANN e GRAHAN, 1993). Como divisão estrutural básica, esta célula apresenta: cabeça, que no eqüino é de forma oval e achatada, onde se encontra a cromatina altamente condensada que compreende um complexo DNA (BARTH e OKO, 1989). Na região exterior da cabeça tem-se o acrossoma, estrutura de parede dupla que se situa entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, onde se encontram as enzimas hidrolíticas envolvidas diretamente no processo de fecundação (EDDY e O'BRIEN, 1994), pela interação entre os seus receptores e os da zona pelúcida do ovócito (AMANN e GRAHAN, 1993). O colo serve como ligação da cabeça com a peça intermediária, local onde se encontram as mitocôndrias dispostas em forma de hélice, que convertem a glicose em ATP e liberam energia para a célula (AMANN e GRAHAM, 1993; ALBERTS, 2004). As fibras densas que se iniciam na peça intermediária continuam ao longo da célula e compõem a peça principal, a qual é envolvida por uma bainha protéica, e a cauda que é a última porção do espermatozoide (MAKINNON e VOSS, 1993; SQUIRES et al., 1999).

### **2.2 Plasma Seminal**

Segundo Kraus et al. (2005), o plasma seminal é fundamental para as funções espermáticas desde a ejaculação até a fertilização. Este fluido possui inúmeros componentes para a sobrevivência e o funcionamento dos espermatozóides, como as proteínas do fluido seminal que são encontradas em grande quantidade e são fisiologicamente importantes para as células espermáticas. A composição, o tamanho e a conformação dessas proteínas são específicos para cada espécie (EDWARD et al., 1981; JELÍNKOVÁ et al., 2003).

As principais funções do plasma seminal são nutrição, diluição, veículo e defesa dos espermatozóides (MILLER et al., 1990), onde estão presente as substancias

antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas que atuam combatendo as ROS, como vitaminas A e C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (BAUMBER et al., 2000; ALMEIDA e BALL, 2005).

Além destas substâncias, componentes orgânicos e inorgânicos como aminoácidos, íons, bicarbonato, frutose, sorbitol, inositol, antimicrobianos, imunoglobulinas e uma variedade de substâncias hormonais estão presentes em várias quantidades no plasma seminal das diferentes espécies (GARNER e HAFEZ, 2004). Essa diversidade não é encontrada apenas entre as espécies mamíferas, mas também entre raças de uma mesma espécie, como observada em caprinos (PINHEIRO et al., 1996).

A proteção contra ROS e prevenção contra danos celulares através das substâncias antioxidantes são fatores fundamentais para a eficiência reprodutiva, já que a baixa capacidade antioxidante total encontrada no sêmen apresenta correlação direta com os índices de infertilidade (GUERRA et al., 2004).

Todavia, alguns estudos demonstram diferenças na qualidade dos ejaculados em relação ao fotoperíodo e a fatores alimentares (COLAS, 1980; NUNES, 1982; TULE e HOLTZ, 1995; PINHEIRO et al., 1996).

Apesar dos benefícios promovidos pela composição química do sêmen, estudos comprovaram que, quando criopreservados, algumas proteínas podem atuar de forma deletéria aos espermatozóides, como por exemplo, a *horse seminal protein* (HSP), que corresponde a, aproximadamente, 20% da proteína total do ejaculado equino e atua viabilizando o processo de fertilização. Estas proteínas são prejudiciais à criopreservação, por induzirem a saída de lipídios da membrana plasmática (BERGERON e MANJUNATH, 2006). Em virtude de alguns protocolos de criopreservação, especialmente os de congelação de sêmen, utilizar a centrifugação do ejaculado, bem como quantidades elevadas de diluentes e retirada total ou parcial do plasma seminal, que é substituído pelo diluente podem ocorrer danos irreversíveis aos componentes celulares. (BRINSKO et al., 2000).

### **2.3 Preservação do Sêmen por Refrigeração**

As primeiras constatações de que a diminuição da temperatura causa redução reversível da atividade metabólica dos espermatozóides, permitindo seu armazenamento, foram realizadas por Spallazani em 1776 (JOHNSTON, 2000). A

refrigeração do sêmen visando sua posterior utilização na IA determina menos danos às células espermáticas, quando comparados à congelação, resultando em taxas mais elevadas de prenhez, principalmente nas espécies ovina, bovina, caprina e equina (ENGLAND e PONZIO, 1996).

A refrigeração do sêmen pode ser realizada de forma automatizada, que consiste em um aparelho de refrigeração com taxas decrescente de temperatura rigorosamente controlada, ou de forma convencional, que é mais difundida comercialmente na reprodução equina devido ao baixo custo (VALLE et al., 1999).

A técnica de refrigeração convencional utiliza uma caixa isotérmica que proporciona a redução gradativa da temperatura. No entanto, essas taxas de redução de temperatura sofrem interferências da temperatura ambiente, do volume da amostra e da temperatura inicial da amostra (VALLE et al., 1999).

Existem várias opções comerciais de sistema convencional de refrigeração de sêmen. O mais conhecido é o Equitainer®, em duas versões (Equitener® I e Equitener® II), desenvolvido por Douglas Hamilton e colaboradores na década de 80, cujo custo elevado fez surgir no mercado modelos nacionais economicamente viáveis, que são mais baratos. Dentre os modelos nacionais, há os mais especializados de material mais resistente, como o Botu-Box® e o Botutainer®, e modelos mais simples, como o Max-Sêmen Express®. Ressalta-se que os dois primeiros são utilizados para armazenamento máximo de 24 horas, com temperatura final de 15 °C, enquanto o penúltimo permite o armazenamento com temperatura final de 5 °C, por no máximo de 48 horas (SOBREIRA NETO, 2008).

Segundo Gunzel-Apel e Krause (1986), a fertilidade do sêmen refrigerado é de, no máximo, 72 horas. No entanto, Feldmen e Nelson (1996) afirmaram que, se o sêmen for adequadamente diluído e refrigerado, os espermatozóides podem permanecer viáveis por até cinco dias. Desta forma, o que determina a boa qualidade do sêmen refrigerado são a qualidade do sêmen *in natura*, a qualidade do diluente, a forma de refrigeração e até mesmo o indivíduo (SQUIRES et al., 1999).

#### **2.4 Fatores que Afetam a Viabilidade do Sêmen Equino Refrigerado**

De acordo com Moran (1982), o processo de refrigeração do sêmen da temperatura corpórea à temperatura ambiente (20 °C) aparentemente não causa danos aos espermatozóides, desde que diluído em meio adequado. No entanto, no processo de

refrigeração existe uma faixa crítica de temperatura (de 19 a 8 °C), em que o espermatozóide pode ser severamente lesado. Isto se dá devido à membrana plasmática apresentar-se como um mosaico fluido, onde os lipídios e as proteínas estão em constante movimento, garantindo sua funcionalidade à temperatura ambiente (JASKO, 1994). Assim, com a redução da temperatura, os lipídios passam para um estado de gel e as cadeias de ácidos graxos vão se apresentar de forma rígida e paralela. Por conseguinte, com a redução da temperatura, a membrana sofre alteração de sua função devido à perda de mobilidade das proteínas (AMANN e GRAHAM, 1993).

Quando o processo de refrigeração é realizado de forma inadequada, os espermatozoides ficam sujeitos ao choque térmico (WATSON, 2000), resultando em enrolamento da cauda e, conseqüentemente, ocorrência de movimentos em círculos, redução do metabolismo, danos à membrana plasmática e ao acrossoma (PICKETT e AMANN, 1992).

Parks e Graham (1992), em estudos realizados com sêmen equino, constataram que a adição de colesterol aos espermatozoides aumentou a porcentagem de gametas móveis e com membrana intacta. Este resultado foi atribuído ao fato de o colesterol manter o estado fluido da membrana na temperatura de transição. Moran et al. (1992) recomendaram que o processo de refrigeração do sêmen seja realizado em taxas decrescentes de temperaturas, em torno de 0,3 °C por minuto, principalmente no intervalo crítico de 19 a 8 °C, para serem armazenados pelo período de 24 a 48 horas.

Outro fator que deve ser considerado, é que grande parte do sucesso do processo de refrigeração do sêmen depende de cada ganhão (FRANCL et al., 1987; PICKETT, 1993).

## **2.5 Diluentes para Sêmen Equino**

Sabe-se que diluente para sêmen é um preparado líquido, acrescido ao ejaculado, visando aumentar o volume da amostra, assim como nutrir e proteger os espermatozoides. Todavia, deve possuir osmolaridade compatível com a amostra, proteger as células em caso de mudanças bruscas de temperatura, neutralizar os produtos tóxicos, ter condições apropriadas de nutrientes, estabilizar o sistema enzimático e garantir a integridade da membrana plasmática (MELO, 2005).

Para eqüinos, vários diluentes têm sido desenvolvidos com composição variada, porém na grande maioria estas substâncias são elaboradas à base de gema de ovo e,

principalmente, leite desnatado. No entanto, a gema de ovo tem seu mecanismo de proteção espermática ainda desconhecida. Entretanto, de acordo com Bergeron e Manjunath (2006), a associação da lipoproteína da gema de ovo à membrana plasmática tem a função de estabilizá-la pela a formação de uma película protetora de fosfolipídios na superfície, repondo os fosfolipídios e competindo com os peptídeos deletérios presentes no plasma.

Diluentes à base de leite apresentam a caseína, que é a proteína do leite, e os carboidratos vão atuar na proteção celular auxiliando no tamponamento fisiológico (BATTELIER et al., 2001; BERGERON e MANJUNATH, 2006). Porém, deve-se levar em consideração a grande complexidade da composição do leite, sendo possível uma presença bastante diversa de substâncias benéficas e maléficas, como a  $\alpha$ -lactoalbumina, que é uma proteína solúvel encontrada no leite, prejudicial à sobrevivência dos espermatozoides (SILVEIRA NETO, 2008).

Visando potencializar a atividade protetora dos diluentes por refrigeração, em todos os produtos disponíveis no mercado, tem-se utilizado a adição de antibióticos (AMMAN e PICKETT, 1987).

Recentemente foi criado o diluente para refrigeração de sêmen à base de água de coco. Segundo Blume e Marques Junior (1994), sua densidade e pH são compatíveis com o plasma sanguíneo, além de ser composto de sais, proteínas, açúcares, vitaminas e gorduras neutras (NUNES e COMBARNOUS, 1995), proporcionando nutrientes necessários para manter a sobrevivência dos gametas masculinos. Vários estudos vêm sendo realizados com a utilização da água de coco como diluente, apresentando resultados favoráveis em amostras de sêmen de caprinos (SALGUEIRO et al., 2003), ovinos (SALGUEIRO et al., 2004), suínos (TONIOLLI e MESQUITA, 1990), caninos (UCHÔA et al., 2002), peixes de água doce (FARIAS et al., 1999) e humanos (NUNES e COMBARNOUS, 1995). Em eqüinos, Sampaio (2002) observou a motilidade dos espermatozoides refrigerados à 4 °C por 6 horas, constatando, em média, motilidade total de  $77,5 \pm 7,5\%$  e motilidade progressiva de  $67,5 \pm 7,5\%$ , evidenciando efeito positivo para a utilização da água de coco em amostras de sêmen desta espécie (SILVEIRA NETO, 2008).

## 2.6 Espécies Reativas de Oxigênio e Antioxidantes

O estresse oxidativo é um fator que está associado ao declínio da capacidade fecundante dos espermatozóides durante o armazenamento do sêmen sob refrigeração. A formação de ROS é uma consequência do metabolismo oxidativo e, segundo Maxwell e Stojanov (1996).

Atualmente já existe o consenso de que a criopreservação induz à formação de ROS, uma das causas de redução da capacidade fertilizante dos espermatozóides (WATSON, 2000). Em 1977, Jones e Mann descobriram que o processo de peroxidação lipídica induz alterações estruturais e irreversíveis aos espermatozóides, como perda de motilidade, alterações no metabolismo e descontrole no trânsito de componentes intra e extra-celulares através da membrana (VALENÇA e GUERRA, 2007).

O plasma seminal e a célula espermática possuem mecanismos de defesa antioxidantes. O espermatozoide possui um sistema intracelular contra ROS, principalmente composto por enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reduzida (GSH), assim como um sistema de defesa não enzimático, como o  $\alpha$ -tocoferol e o ácido ascórbico (AITKEN, 1995). Por sua vez, o plasma seminal atua na proteção das células espermáticas por ação de várias ROS enzimáticas e não-enzimáticas (ZINI et al., 2000; Van OVERVELD et al., 2004). Para Ferreira e Matsubara (1997), esses sistemas podem atuar como removedor do agente oxidante, antes que ele ocasione lesão celular, ou como agente reparador da lesão já ocorrida.

Segundo Aitken (1995), a capacidade biossintética do espermatozoide é limitada, tornando difícil para este gameta substituir qualquer molécula que tenha sido danificada. Além disso, a enzima antioxidante pode estar concentrada na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida (MAIA, 2003). Por isso, o plasma seminal é importante na proteção espermática contra os efeitos causados pelas ROS geradas pelos próprios espermatozóides e pelos fagócitos presentes no ejaculado (BAUMBER et al., 2002).

Uma vez que os ejaculados utilizados para congelamento, refrigeração ou mesmo *in natura* na inseminação, especialmente de éguas, sofrem adição de diluente, vários estudos estão sendo realizados visando enriquecer esses diluentes, adicionando substâncias antioxidantes na sua composição (GUERRA et al., 2004).

### 2.6.1 Glutationa peroxidase (GPx)

Dentre os sistemas fundamentais de defesa celular enzimática, a glutaciona peroxidase (GPx) converte o peróxido de hidrogênio a H<sub>2</sub>O pela oxidação da glutaciona a glutaciona dissulfeto, a sua forma oxidada (MAIA, 2003).

A Glutaciona é um tripeptídeo ( $\gamma$  – L – glutamyl – L – cisteinyl – glicina) que está presente no organismo nas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). Ela atua de forma direta e indireta em muitos processos biológicos importantes, como síntese de proteína, metabolismo e proteção celular (MEISTER e ANDERSON, 1983). Alguns problemas na síntese e metabolismo da glutaciona estão associados a doenças, nas quais as concentrações de glutaciona e de enzimas que atuam em seu metabolismo podem ser bastante significativas no diagnóstico de alguns tipos de câncer e outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DENEKE et al., 1989; NAVARRO et al., 1999). As ROS podem também estar envolvidas em processos patológicos ou associadas a exercícios físicos prolongados, proteínas e ao ácido desoxirribonucleico (DNA) das membranas celulares (NAVARRO et al., 1999). Assim, um importante sistema de defesa enzimática contra o aumento das ROS envolve a enzima GPx que está presente em muitos tecidos de origem animal (MANNERVIK et al., 1985).

Segundo Rover Júnior (2000), a GPx foi descrita inicialmente por Mills em 1957, que relatou que esta enzima não é encontrada em plantas superiores ou bactérias. A atividade enzimática da GPx é um dos meios de controle do organismo das concentrações de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, provenientes da ação de espécies radiculares (COHEN et al., 1963 citado por ROVER JÚNIOR et al., 2000; MEISTER et al., 1983). A ação da GPx se dá por catalisação da redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e outros peróxidos orgânicos para seus alcoóis correspondentes, convertendo GSH em GSSG (NORDBERGER e ARNER, 2001).

A GPx, assim como outros antioxidantes, vem sendo pesquisada e avaliada quanto à sua ação no sêmen, principalmente em espécies animais de produção. Esta enzima apresenta um resíduo de cisteína contendo selênio covalentemente ligado ao restante da enzima (ROTRUCK et al., 1973 citado ROVER JÚNIOR, 2000). Além disso, a glutaciona é o maior tiol não protéico, dentre os componentes das células dos mamíferos, tendo várias funções como transporte de aminoácidos, síntese protéica e de DNA, redução de cadeias de dissulfeto e proteção contra estresse oxidativo (VALENÇA e GUERRA, 2007).

Segundo Nordberg e Arnerg (2001), existem 4 tipos de GPx (GPx 1, GPx 2, GPx 3 e GPx 4). Dentre elas, a GPx 4 é a que está mais associada a benefícios ao espermatozóide. Imai e Nakagawa (2003) afirmaram que a GPx 4 pode agir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios, sendo considerada responsável pela proteção da membrana contra os danos oxidantes. Além disso, uma variante da GPx 4 é encontrada especificamente no núcleo do espermatozoide, onde participa da condensação da cromatina espermática (NORDBERG e ARNER, 2001). Esta enzima tem, ainda, dupla função na célula espermática, sendo enzimaticamente ativa na espermátide e insolúvel, funcionando como uma proteína estrutural do espermatozoide maduro (MAIA, 2003).

### 2.6.2 Cisteína

A cisteína é um aminoácido de baixo peso molecular que contém um grupo tiol com ação redutora (BILODEAU et al., 2001; MELO et al., 2006), e uma de suas formas é usada como agente mucolítico. Essa substância apresenta ação antioxidante (PASQUALOTTO et al., 2009) e tem sido relatado que a mesma pode contribuir na prevenção de alguns tipos de câncer (ESTERDEN, 1999).

Por participar da biossíntese intracelular da GPx que, por sua vez atua na proteção contra o estresse oxidativo, a cisteína tem sido bastante utilizada em experimentos com antioxidante para sêmen de várias espécies animais. Ela tem demonstrado capacidade de penetrar nas membranas celulares, atuando como agente antioxidante direto e/ou por sua correlação com a GPx (MENEZES et al., 2009). Segundo Michael et al. (2008), vários estudos foram realizados com adição da cisteína em diluentes de sêmen com resultados controversos. Em equinos têm-se poucos estudos sobre a utilização da cisteína como antioxidante no diluente de sêmen.

No entanto, Safarinejade (2008) constatou que a suplementação de um tipo de cisteína, associada ao selênio, melhora a qualidade seminal em humanos, e defende a sua utilização no tratamento da infertilidade masculina. Uysal e Bucak (2007) testaram diferentes concentrações de cisteína adicionada ao sêmen congelado de carneiros e obtiveram resultados positivos na manutenção das características do sêmen descongelado. Funahashi e Sano (2005) relataram que um diluidor de sêmen com 5mM de cisteína melhora a viabilidade e a integridade da membrana das células espermáticas em javalis.

**Segundo** Meister e Tate (1976), sob condições *in vitro*, a cisteína atua na proteção da célula espermática por sua ação na formação da peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides. Gabitta et al. (2000) observaram que a glutatona oxidada (GSSG) interage com o sítio ativo de proteínas livres e que sítios com resíduos de cisteína vão favorecer a ação antioxidante, com resultados positivos.

## 2.7 Métodos de Avaliação do Sêmen Equino com Sondas Fluorescentes

A avaliação dos espermatozoides por meio de microscópio vem evoluindo bastante. A princípio, esta análise se restringiu ao uso do microscópio ocular, limitada à concentração, motilidade e vigor espermáticos. Em seguida, surgiu o microscópio de contraste de fase, tornando possível avaliar o *status* do acrossoma em espécies que apresentam esta estrutura grande, diferente dos eqüinos (TOLBOT e CHACON, 1981; CROSS e MEZEL, 1989). Depois surgiu a microscopia eletrônica, que, embora seja um método bastante eficaz, possui um custo elevado e é de difícil utilização na rotina da maioria dos laboratórios (ZEGINADOU et al., 2000). Atualmente pode-se utilizar tanto com a microscopia de fluorescência quanto com os métodos mais modernos de avaliação por sistema computadorizado, como CASA (*Computer Assisted Semen Analyses*).

Com o advento da microscopia de fluorescência, tornou-se possível a realização de novos exames com o uso de sondas adequadas, resultando em maior precisão e nitidez de detalhes. As principais sondas utilizadas possibilitam a avaliação da integridade da membrana, do acrossoma e das mitocôndrias. Denomina-se fluorescência a propriedade de certas substâncias que, ao serem excitadas por uma luz de comprimento de onda curta, emitem luz de um comprimento de onda maior. Emprega-se, para tanto, luz ultravioleta de comprimento de onda inferior a 350 nm, de forma a se obter radiações emitidas na gama de 400 a 700 nm. Isto é, dentro do espectro da luz visível (Disponível em: [www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/mftecnicas.htm](http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/mftecnicas.htm)).

Segundo Neild (2005), a grande vantagem do uso das sondas fluorescentes é o maior contraste, associada à menor variabilidade e maior especificidade, em comparação aos métodos clássicos de coloração. Sua ação se dá por uma interação com a célula espermática, apresentando coloração que vai indicar a existência de lesão na

estrutura analisada. A imagem observada é o resultado da radiação eletromagnética emitida pelas moléculas que absorvem a excitação primária e re-emitem uma luz com maior comprimento de onda. Para deixar passar somente a emissão secundária desejada, devem-se utilizar filtros apropriados (JAMESON, 2009).

#### 2.7.1 Diacetato de carboxifluoresceína (DCF) e iodeto de propídio (IP)

A integridade da membrana do espermatozóide é um bom indicador de viabilidade da célula (MAGISTRINI et al., 1997). Sondas fluorescente como as DCF e IP podem ser usadas para avaliação da integridade de membrana em microscópio de fluorescência (SMITH e MURRAY, 1997).

O DCF é um composto hidrofóbico, capaz de penetrar na membrana celular sem interferir fisiologicamente em seu interior, hidrolisado por ação enzimática de interação e convertido em composto hidrofílico, com incapacidade de passar pela membrana espermática. Assim, este composto se acumula no interior da célula, onde, quando expostos a luz azul, se excita e emite a coloração verde, característica de membrana íntegra (GARNER e JONHSON, 1995).

O IP é um corante que só penetra através de membranas lesionadas. Este composto se liga ao DNA da célula, corando-o em vermelho. Portanto, células onde se observa a coloração vermelha são características de membrana danificada (HARRISON e VICKER, 1990).

#### 2.7.2 Carboxianina fluorescente (JC-1)

A mitocôndria tem sido objeto de estudo mais intenso nas duas últimas décadas. Esta organela é essencial para manutenção da fisiologia espermática e responsável pela produção da maior parte da energia a partir da geração de ATP, possibilitando o movimento celular (CÂMARA e GUERRA, 2008). Segundo Copeland (2002), a mitocôndria é responsável por aproximadamente 90% da produção de energia celular.

A avaliação do potencial de membrana mitocondrial com JC-1 tem sido utilizada em vários tipos de células, dentre elas os espermatozóides de bovinos. Em 1999, Gravance et al. utilizaram esta sonda no sêmen equino e relataram que ela pode ser utilizada na avaliação do potencial de membrana mitocondrial com sucesso nesta espécie.

O JC-1 tem sido associado diferencialmente à célula com potencial de membrana mitocondrial alto ou baixo (COSSARIZA et al., 1993). Esta sonda possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para a detecção por sistemas de filtros, comumente usados em microscopia de epifluorescência (SMILE et al., 1991). Este corante possui a capacidade de formar multímeros, conhecidos como J-agregados, após seu acúmulo no interior das mitocôndrias com elevado potencial de membrana (GRAVANCE et al., 1999). Além disso, o JC-1 pode formar monômeros nas mitocôndrias com baixo potencial de membrana, permitindo, assim, a diferenciação de células com potencial de membrana mitocondrial alto e baixo (GRAVANCE et al., 1999). A excitação do JC-1 se dá com emissão do monômero na faixa verde (530nm) e emissão de I-agregados na laranja mitocondrial com comprimento de onda alto (590nm) (KULKAMI, 1998).

Sendo assim, em mitocôndrias funcionais e que apresentam potencial de membrana mitocondrial altamente negativo (-180mv), o JC-1 penetra e se acumula no interior desta organela, emitindo coloração vermelha (REERS, 1991).

### 2.7.3 Isoticianato de fluoresceína (FITC) e Aglutinina de *Arachis hypogea* (PNA)

O acrossoma dos espermatozóides possui em sua estrutura uma considerável quantidade de carboidratos nos quais as lectinas se ligam (JONES et al., 1988 *apud* OLIVEIRA, 2007). O Isoticianato de fluoresceína (FITC) é uma sonda fluorescente que conjugada ao *Arachis hypogea* (PNA), vem sendo utilizada com sucesso para avaliar o acrossoma de várias espécies animais (OLIVEIRA, 2007). O PNA é oriundo do amendoim, se liga a galactose, presente na membrana acrossômica externa, não se ligando à plasmática (ZEGINIADOU et al., 2000). Casey et al. (1993) utilizaram a associação de FITC-PNA em espermatozóides de garanhões e obtiveram sucesso em suas avaliações de acrossoma.

A associação de FITC-PNA é utilizada em preparações que realizam a prévia permeabilização da membrana plasmática através do uso de substâncias como metanol ou etanol. Assim, a sonda tem acesso a toda superfície da membrana acrossômica e pode apresentar fluorescência em todas as células não reagidas, visto que não existe a barreira da membrana plasmática. Diversos padrões de fluorescência representam a fusão parcial da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, característica de células que estão sofrendo reação acrossômica (OLIVEIRA, 2007). A

coloração com FITC-PNA também pode ser utilizada sem a permeabilidade da membrana plasmática, tornando fluorescente a região acrossômica das células que estão sofrendo reação. Uma vez que esta sonda conjugada não é penetrante a membrana plasmática, ela somente será capaz de se ligar à membrana acrossômica externa nas células em que houve a formação de poros na membrana plasmática (KISK, 2001; RAITHI et al., 2001)

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS et al. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In:\_\_. **Biologia Molecular da Célula**. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 10, p.583-595.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1993.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation on stallion spermatozoa, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

BARTH, A. D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa University Press, 1989. 285p.

BATTELIER, F.; VIDAMENT, M.; FALQUANT, J.; DUCHAMP, G.;ARNAUD, Ç.;YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BAUMBER, J; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 18, p. 97-104, 1994.

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

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by haemolytic agents. **Biochemistry**, 2, 1420, 1963.

COLAS, G. Variations saisonnières de la qualité Du sperme chez Le belier Ile-de-France I. Etude de La morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, v. 20, n. 6, p. 1789-1799, 1980.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeito de diferentes períodos de equilíbrio e meios diluidores sobre o sêmen canino congelado e descongelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 470-471, 2001.

- DENEKE, S.; FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, 257, L163, 1989.
- EDWARDS, J.J.; TOLLAKSEN, S.L.; ANDERSON, N.G. Protein of Human Semen. In: Two-Dimensional mapping of human seminal fluid. **Clinical Chemistry**, v. 163, p. 1335-1340, 1981.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The Physiology on Reproduction**. 2ed. New York: Raven Press, 1994. cap. 2, p. 29-77.
- ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v.46, p. 165-171, 1996.
- FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M. et al. Avaliação "in vitro" e "in vivo" do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER) conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In: \_\_\_\_\_ (eds), **canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1996. p. 734-739.
- FERREIRA, A.L.A e MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.** v.43, n.1, p.1-16, 1997.
- FRANCL, A.T., AMANN, R.P., SQUIRES, E.L. et al. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. **Theriogenology**, v. 27, p. 517-524, 1987.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, p. 97 – 110, 2004.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1697-1703, 2000.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.
- GÜNZEL-APEL, A. R.; KRAUSE, D. Laufigkeitsüberwachung und Samenübertragung beim hund. **Hannover Tierärztliche Hochschule**, v. 8, p. 564-570, 1986 (abstract).
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v. 10, p. 156-170, 1994.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. et AL. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biology Macromolecules**, v. 32, p. 99-107, 2003.

JOHNSTON, S. Canine reproduction: lessons in reproductive biology. **Annual Conference of Society for Theriogenology**, 17, Illinois, 2000. Disponível em: <http://www.hilltopanimalhospital.com/therio%20history.htm>. Acesso em 20 de março de 2010.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et AL. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQM Spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, p. 33-46, 2005.

LIPAR, J.L.; KETTERSON, E.D.; NOLAN, V.J.R.; CASTRO, J.M. Egg yolk, layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **Genetic Compendium of Endocrinology**, v. 115, p. 220-227, 1999.

MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y. et al. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, n.7, p. 1229-1235, 1997.

MANNERVIK, B. **Methods in Enzymology: Glutathione peroxidase**. New York: Academic Press, 1985. 490 p.

McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 1ed., Pennsylvania: Lea & Febizer, 1993. 1137p.

MELO, N.S.S. **Efeitos de diferentes concentrações de crioprotetores na congelação de sêmen equino**. Brasília, 2005. 71p. Dissertação (Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2005).

MEISTER, A.J.; A.; ANDERSON, M. E.; **Annual Review of Biochemistry**, 1983, 52, p.711-760.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULUS C.; PONTIKI, E.A. et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-212, 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais Domésticos**. 6ed. Porto Alegre: Sulina 1987. 305p.

MILLER, D.J.; WINER, M.A.; AX, R.L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, p. 899-915, 1990.

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

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J.M.; Changes in glutathione status and the antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 3/4, p. 410-418, 1999.

NEILD, D.M. **Evaluation of equine sperm membrane function: effects of cryopreservation**. 2005. 110f. Tese (Doutorado em 2004) – Faculty of Veterinary Sciences, Utrecht University, Utrecht. 2005.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: I SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA

REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1995, p. 53-63.

NUNES, J. F. **Étude des effets du plasma seminal sur la survie in vitro des espermatozoides de bouc.** 1982. 45 f. Tese (Ciências da Vida)- Université Paris VI, Paris, 1982.

SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B. et al. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides espermatozoides após descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 42-49, 2009.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, C.H. **Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas.** Dissertação de mestrado, UFMG. Disponível em <http://hdl.handle.net/1843/SSLA-7UDHRY>. 2007.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 210-222, 1992.

PEÑA, A.I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity.** 2000. 46 f. Thesis (Doctoral) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2000.

PICKETT, B.W. **Seminal extenders and cooled semen.** In: Equine Reproduction. McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Pennsylvania: Lea & Febizer, p. 746-754, 1993.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, p. 4480-4486, 1991.

ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G.; HOEKSTRA, W.G. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium; **Science**, v. 179, p. 588, 1973.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E. et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 377-378, 2003.

SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M.; NUNES, J.F. et al. Artificial insemination of sheep with semen extended on powder coconut water (ACP-102®), cooled and maintained at 4°C for 48 hours. 2004. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 374, 2004.

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F.. Utilização do diluente ACP-105 na refrigeração do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 137-139, 2002.

SARLOS, P.A.; MOLNÁR, M.; KÓKAI, G.Y.; GÁBOR, J.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.

- SILVA, K.M.G.; GAMBOA, S.C.; RODRIGUES, A.S.; SANTOS, J.R.; GUERRA, M.M.P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2271-2277, 2008.
- SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K.; PRASAD, R.L. The effect of glutathione on the motility enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.
- SMILE, S.T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic JC-1. **Cell Biology**, v. 88, p. 3671-3675, 1991.
- SMITH, J.F.; MURRAY, G.R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, p. 246-250, 1997.
- SOBREIRA NETO, J.A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP105) e refrigerada a 5 C°**. Dissertação de mestrado-Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, D.K. et al. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n. 9 p. 3-36, 1999.
- TALBOT, P.; CHACON, R. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 2, p. 201-208, 1981.
- TALBOT, P.; SUMMERS, R. G.; HYLANDER, B. L. et al. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. **Journal of Experimental Zoology**, v. 198, n. 3, p. 383-392, 1976.
- TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com B.T.S. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, p. 249-254, 1990.
- TULI, R.K.; HOLTS, W. Effects of season on the freezability of boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, v. 43, p. 1359-1363, 1995.
- UCHOA, D.C.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl., n. 5, p. 150-152, 2002.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.
- VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. et al. Utilização de um container modelo CELLE modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 505-514, 1999.
- Van OVERVELD, F.W.P.C.; HAENEN, G.R.M.M.; RHEMREV, J. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico-Biological Interactions**, v. 127, p. 151-161, 2000.
- WATSON PF. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, n. 2, p. 481-492, 2000.

ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. **Andrologia**, v. 32, n. 9, p. 335-343, 2000.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v. 55, n. 6, p. 922-926. 2000.

## **4 EXPERIMENTO**

#### **4.1 Efeito da adição de glutathiona peroxidase e cisteína aos diluidores Botu-sêmen® e ACP-105® na viabilidade de espermatozoides refrigerados de equinos**

*Effect of cysteine and glutathione peroxidase addition to Botu-Semen® and ACP-105® extenders on the viability of equine chilled spermatozoa*

**Victor Netto Maia, Felipe Costa Almeida, Sildivane Valcácia Silva, Gustavo Ferrer Carneiro, Pierre Castro Soares, Maria Madalena Pessoa Guerra**

#### **Resumo**

Objetivou-se estudar o efeito da adição dos antioxidantes glutathiona peroxidase e cisteína aos diluidores Botu-sêmen® e ACP-105® na viabilidade de espermatozoides refrigerados de equinos. Foram utilizados quatro reprodutores da raça Mangalarga Marchador, submetidos a colheitas de sêmen com vagina artificial e fêmea como manequim. As amostras de sêmen foram avaliadas e diluídas em Botu-sêmen® ou ACP-105®, de acordo com os grupos experimentais: G1 = Botu-Sêmen®; G2 = ACP-105®; G3 = Botu-Sêmen® + 5U de Glutathiona Peroxidase; G4 = ACP-105® + 5U de Glutathiona Peroxidase; G5 = Botu-Sêmen® + 5 mM de Cisteína; G6 = ACP-105® + 5 mM de Cisteína; G7 = Botu-Sêmen® + 5 U de Glutathiona Peroxidase + 5 mM de Cisteína e G8 = ACP-105® + 5 U de Glutathiona Peroxidase + 5 mM de Cisteína. As amostras de cada grupo experimental foram colocadas, em triplicata, em duas caixas de refrigeração (14 °C; Botu-box®) e submetidas à avaliação quanto à motilidade total, vigor, integridade de membrana e de acrossoma, e potencial da membrana mitocondrial, após zero (T<sub>0</sub>), 12 (T<sub>12h</sub>), 24 (T<sub>24h</sub>) e 36 horas (T<sub>36h</sub>) de refrigeração. A análise da MT evidenciou no T<sub>12h</sub>, que as amostras do grupo Botu-sêmen® e Botu-sêmen® + GPx + cisteína apresentaram maior (P<0,05) MT do que a de ACP-105® + cisteína. Enquanto no T<sub>24h</sub>, as amostras diluídas em Botu-sêmen® + GPx + cisteína apresentaram maior (P<0,05) motilidade total do que as diluídas em ACP-105® e ACP-105® + cisteína. O vigor espermático, no T<sub>12h</sub>, foi maior (P<0,05) nas amostras de Botu-sêmen® + GPx + cisteína do que nas de ACP-105® e ACP-105® + cisteína. No T<sub>24h</sub>, de ACP-105® + GPx e Botu-sêmen® + GPx + cisteína foram maiores (P<0,05) do que as de ACP-105® e ACP-105® + cisteína. A integridade de membrana mitocondrial não diferiu (P>0,05) entre grupos, em todos os tempos de avaliação, enquanto a integridade de acrossoma, no T<sub>24h</sub>, foi maior (P<0,05) nas amostras de ACP-105® + cisteína do que nas de Botu-sêmen®. O potencial de membrana mitocondrial não diferiu (P>0,05) entre grupos após 12, 24 e 36 h de incubação. Com base nos resultados, conclui-se que o ACP-105® não se mostrou um bom diluente para a preservação de sêmen equino refrigerado e que o uso da GPx e da cisteína pode contribuir com a preservação destas células espermáticas.

**Palavras-chave:** Botu-Sêmen®, ACP-105®, refrigeração, sêmen, equino.

## Abstract

The objective was to study the effect of adding the antioxidant glutathione peroxidase and cysteine to semen extenders Botu<sup>®</sup> and ACP-105<sup>®</sup> in sperm viability of equine chilled. We used four players Mangalarga Marchador crops undergo semen artificial vagina and female as the dummy. Semen samples were evaluated and diluted semen-Botu<sup>®</sup> or ACP-105<sup>®</sup>, according to the experimental groups: G1 = Botu-Semen<sup>®</sup> G2 = ACP-105<sup>®</sup>, G3 = Botu-5U Semen<sup>®</sup> Glutathione Peroxidase, G4 = 5U ACP-105<sup>®</sup> Glutathione peroxidase; = G5-Botu Semen<sup>®</sup> 5 mM cysteine and G6 = ACP-105<sup>®</sup> 5 mM cysteine; G7 = Botu-Semen<sup>®</sup> 5 U of glutathione peroxidase and 5 mM cysteine G8 = ACP-105<sup>®</sup> 5 U of glutathione peroxidase 5 mM cysteine. Samples of each experimental group were placed in triplicate in two boxes cooled (14 ° C; Botu-box<sup>®</sup>) and subjected to total assessment for motility, vigor, membrane integrity and acrosome and mitochondrial membrane potential, after zero (T0), 12 (T12h), 24 (T24h) and 36 hours (T36h) cooling. The analysis of MT in T12h showed that the samples of group-Botu<sup>®</sup> semen and semen-Botu<sup>®</sup> GPx cysteine had higher (P <0.05) than the MT of ACP-105<sup>®</sup> cysteine. While in T24h, the diluted semen in Botu<sup>®</sup> GPx-cysteine had higher (P <0.05) total motility than those diluted in ACP-105 and ACP-105<sup>®</sup> cysteine. The spermatic in T12h was higher (P <0.05) in semen samples Botu<sup>®</sup> GPx-cysteine than in the ACP and ACP-105<sup>®</sup> cysteine-105. In T24h of ACP-105<sup>®</sup> GPx and GPx<sup>®</sup> Botu semen-cysteine were higher (P <0.05) than those of ACP and ACP-105<sup>®</sup> cysteine-105. The integrity of mitochondrial membrane did not differ (P > 0.05) between groups at all times of evaluation, while the integrity of acrosome, in T24h was higher (P <0.05) in samples of ACP-105<sup>®</sup> cysteine than in the semen-Botu<sup>®</sup>. The mitochondrial membrane potential did not differ (P > 0.05) between groups after 12, 24 and 36 h of incubation. Based on the results, we conclude that ACP-105<sup>®</sup> was not a good solvent for the preservation of equine semen cooled and that the use of GPx and cysteine may contribute to the preservation of these sperm cells.

**Keyword:** Botu-Sêmen<sup>®</sup>, ACP-105<sup>®</sup>, cooling, semen, equine.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização da inseminação artificial (IA) na equinocultura é bastante difundida, em virtude desta biotécnica possibilitar a utilização de reprodutores que se encontram distante das éguas, tornar viável o uso de sêmen importado, aproveitar o ejaculado para mais de uma égua e proteger contra doenças sexualmente transmissíveis, além de ser uma técnica de custo relativamente baixo.

A refrigeração do sêmen é um processo de criopreservação que visa proporcionar maior longevidade às células espermáticas. Em equinos, a grande maioria das IAs são realizadas com sêmen refrigerado e armazenado durante 12 a 36 horas. Segundo Ball et al. (2000), a refrigeração é uma técnica importante na reprodução equina por possibilitar a manutenção da motilidade e da fertilidade do espermatozóide durante um prazo de até 72 horas. No entanto, para que estas células permaneçam

viáveis, é fundamental o uso de diluidor que realize interação de seus diferentes componentes com as células espermáticas (CUNHA e LOPES, 2003), visando prolongar a viabilidade do material genético masculino (SOBREIRA NETO, 2008).

Mesmo sob condições de armazenamento hipotérmico e adição de diluente, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é uma consequência normal do metabolismo oxidativo (BALL et al., 2000) e demonstra estar envolvido no dano sofrido pelos espermatozoides (MAXWELL et al., 1996). A propagação da peroxidação lipídica na membrana das células espermáticas e a formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) têm apresentado correlação com a queda de motilidade, função mitocondrial, integridade de membrana e acrossoma dos gametas eqüinos (BAUMBER, 2000; BALL e BAUMBER, 2001).

Em virtude da formação de ROS e seus prejuízos à fertilidade do sêmen armazenado, vários estudos têm sido realizados, avaliando-se a adição de substâncias antioxidantes aos diluentes de criopreservação do sêmen (GUERRA et al., 2004), visando reduzir a peroxidação lipídica das membranas e, desta forma, preservar a viabilidade das células espermáticas por mais tempo. Por conseguinte, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da adição dos antioxidantes glutathione peroxidase e cisteína aos diluentes Botu-Sêmen® e ACP-105® na viabilidade de espermatozoides refrigerados de equinos.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local do Experimento**

A colheita, fracionamento, diluição e acondicionamento do sêmen para refrigeração foram realizados no Haras Vida Boa, localizado na cidade de Vitória de Santo Antão-PE (8° 7' 35" S, 35° 18' 27" W), durante os meses de abril a junho de 2010. Após processamento, as amostras foram levadas ao Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) da Área de Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde foram realizadas as etapas de avaliação e refrigeração.

## 2.2 Animais

Foram utilizados quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade variando entre 4 e 8 anos, clinicamente sadios, submetidos ao mesmo manejo nutricional e sanitário. Os animais receberam 6 kg de ração balanceada por dia, contendo milho e aveia, sendo três porções de 2 kg, assim como capim de corte (*Pennisetum purpureum*), água e sal mineral *ad libitum*.

Antes das colheitas, os animais foram submetidos a exames clínicos e andrológicos, onde foram classificados aptos à reprodução, conforme os padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998).

## 2.3 Colheita e Avaliação do Sêmen

Cada reprodutor foi submetido a três colheitas de sêmen, a intervalos de 24 horas, totalizando 12 colheitas de sêmen. Para a colheita de sêmen utilizou-se vagina artificial (modelo colorado), aquecida a 42 °C, e lubrificante íntimo K-Y gel®. Como manequim, foi utilizada uma égua em estro.

Após colheita, procedeu-se à filtragem das amostras de sêmen com filtros de nylon específico (nacional, Reproshop®), visando remover o gel e as partículas grandes de debris celulares. A seguir, as amostras de sêmen, sem a fração gelatinosa, foram avaliadas macroscopicamente (coloração, aspecto e volume), colocadas em tubo estéril e procedida a avaliação microscópica, que correspondeu às análises de motilidade total e vigor espermático, realizadas em microscópio óptico (Olympus, Germany; 100x), colocando-se uma gota (10 µL) da amostra de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37 °C, segundo o Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do CBRA (Manual ..., 1998).

## 2.4 Diluição e Refrigeração do Sêmen

Após análise, duas alíquotas (5 mL) de cada ejaculado foram submetidas a diluição (10 mL) utilizando Botu-sêmen® (Biotech Botucatu, Botucatu-SP, Brasil) ou ACP-105® (ACP Biotecnologia, Fortaleza - CE, Brasil). A seguir, a amostra de cada solução (diluyente + sêmen) foi dividida para formar os grupos experimentais, de acordo

com a adição de substância antioxidante: G1 = Botu-sêmen; G2 = ACP-105®; G3 = Botu-sêmen + 5 U de Glutathione Peroxidase (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA); G4 = ACP-105® + 5 U de Glutathione Peroxidase; G5 = Botu-sêmen + 5 mM de Cisteína (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA); G6 = ACP-105® + 5 mM de Cisteína; G7 = Botu-sêmen + 5 U de Glutathione Peroxidase + 5 mM de Cisteína e G8 = ACP-105® + 5 U de Glutathione Peroxidase + 5 mM de Cisteína. As amostras de cada grupo experimental foram colocadas em tubos de microcentrífuga (1 mL), em triplicata, etiquetados, e acondicionadas em duas caixas de refrigeração (14 °C) de sêmen (Botu-box®; (Biotech Botucatu, Botucatu-SP, Brasil), as quais foram protegidas contra o sol. Para maior controle da temperatura de refrigeração, foi colocado em cada caixa um termômetro digital, com visor externo.

## **2.5 Avaliação da Viabilidade Espermática**

As amostras de sêmen foram submetidas à avaliação quanto a motilidade total, vigor, integridade de membrana e de acrossoma e potencial da membrana mitocondrial, imediatamente após a chegada ao laboratório, constituindo o momento zero ( $T_{0h}$ ), assim como após 12 ( $T_{12h}$ ), 24 ( $T_{24h}$ ) de refrigeração a 14 °C e 36 horas ( $T_{36h}$ ) com temperatura de, aproximadamente, 18 °C.

### **2.5.1 Motilidade e vigor espermático**

A motilidade total (MT) e o vigor espermático foram estimados após colocação de uma alíquota (10 µL) de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas (37 °C), observada ao microscópio óptico (Olympus, Germany; 100x), com aprovação das amostras que apresentaram valores mínimos de 70% (0-100%) e 3,0 (0-5), respectivamente, de acordo com o Manual de exame andrológico do CBRA (1998).

### **2.5.2 Integridade da membrana plasmática**

Utilizou-se o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), modificado por Coletto et al. (2002). Alíquotas (50 µL) de sêmen foram diluídas em 150 µL de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 g de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água ultrapura; pH 6,8), contendo 5 µL de DCF (0,46

mg/mL em DMSO) e 20  $\mu$ L de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos a 37 °C e fixadas com PBS contendo 0,5 % de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485/20 nm, e classificados com membrana intacta (IM), quando se apresentavam corados em verde, e com membrana danificada, quando corados em vermelho.

### 2.5.3 Integridade do acrossoma

Os espermatozoides foram corados com a associação do Iodeto de Propídeo e Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA). Alíquotas (5  $\mu$ L) de sêmen foram preparadas para esfregaço e secas ao ar. Uma alíquota de 100  $\mu$ L da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900  $\mu$ L de PBS para obter a concentração final de 100  $\mu$ g/mL. Alíquotas (10-20  $\mu$ L) desta solução foram colocadas sobre lâminas, juntamente com 20  $\mu$ L de IP (0,5 mg/mL em PBS), as quais foram incubadas por 15 minutos em câmara úmida a 37 °C, na ausência de luz. Após incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS e colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5  $\mu$ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e coberto com lamínula.

Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x sob óleo de imersão em microscopia de epifluorescência, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos (IAc), quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossomas reagidos, quando apresentavam faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula.

### 2.5.4 Potencial de membrana mitocondrial

Para uso do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE e WELCH, 2006), duas soluções foram previamente preparadas, sendo uma com Botu-sêmen® e outra

com ACP-105®, acrescida de 5µL de JC-1 (0,15 mM em DMSO), incubadas por 10 minutos (38 °C) e fixadas com PBS contendo 0,5% de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 1000x sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. As células coradas em laranja na peça intermediária foram classificadas com alto potencial de membrana mitocondrial (aPMM), enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo potencial de membrana.

## 2.6 Análise Estatística

Para realização das análises estatísticas, os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F) que separou como causa de variação o efeito de grupos (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 e G8) e tempos de análise do sêmen (0h, 12h, 24h e 36h de refrigeração). Nos casos em que se constatou significância no teste F as médias dos tratamentos foram comparadas pelo Teste de Duncan. Para avaliação de cada grupo em função do tempo, utilizou-se ANOVA e o teste de Tukey. Os dados foram analisados no programa computacional Statistical Analysis System (SAS 2000), utilizando-se o procedimento GLM (General Linear Model) do SAS. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (p) de 5%. O modelo utilizado foi o seguinte:  $Y_{ij} = G + T + GT + E_{ij}$ , onde:  $Y_{ij}$  = valor observado; G = efeito dos grupos; T = efeito dos tempos; GT = Interação entre grupo x tempos;  $E_{ij}$  = erro. Realizou-se, também, análise de correlação de Pearson para pares de variáveis do sêmen, segundo Little e Hills (1978).

## 3 RESULTADOS

Os ejaculados apresentaram volume médio de 40,4 mL, cor branco opalescente, aspecto leitoso a aquoso, motilidade média de 72,92% e vigor médio de 3,5.

Após refrigeração, considerando o tempo de incubação, observou-se no T<sub>12h</sub> que as amostras diluídas em Botu-sêmen® e Botu-sêmen® + GPx + cisteína apresentaram maior (P<0,05) MT (Tabela 1) do que as diluídas em ACP-105® + cisteína. Após

24 horas de incubação ( $T_{24h}$ ), as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) MT do que as diluídas em ACP-105<sup>®</sup> e ACP-105<sup>®</sup> + cisteína. No  $T_{36h}$ , as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPS e cisteína apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) MT do que as diluídas em ACP-105<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + cisteína, ACP-105<sup>®</sup> + cisteína e ACP-105<sup>®</sup> + GPx + cisteína. Avaliando a ação de cada diluente, constatou-se que as amostras com ACP-105<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx, Botu-sêmen<sup>®</sup> + cisteína, ACP-105<sup>®</sup> + cisteína e ACP-105<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) da MT, em relação às amostras de sêmen diluídas e avaliadas antes da refrigeração ( $T_{0h}$ ). Enquanto as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) da MT no  $T_{24h}$ , em comparação ao  $T_{0h}$ , e as amostras ACP-105<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína somente evidenciaram redução ( $P < 0,05$ ) da MT no  $T_{36h}$ , em comparação ao  $T_{0h}$ .

Ao se avaliar a análise do vigor espermático (Tabela 2), em cada tempo de incubação, observou-se que no  $T_{12h}$  as amostras de sêmen diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) valor do que as com ACP-105<sup>®</sup> e ACP-105<sup>®</sup> + cisteína. No  $T_{24h}$ , as amostras diluídas em ACP-105<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram maiores ( $P < 0,05$ ) valores do que as diluídas em ACP-105<sup>®</sup> e ACP-105<sup>®</sup> + cisteína. No  $T_{36h}$ , as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) vigor do que as diluídas em ACP-105<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + cisteína e ACP-105<sup>®</sup> + cisteína. Avaliando a ação de cada diluente, evidenciou que as amostras diluídas em ACP-105<sup>®</sup>, ACP-105<sup>®</sup> + GPx e ACP-105<sup>®</sup> + cisteína apresentaram menores ( $P < 0,05$ ) valores no  $T_{12h}$  do que antes da refrigeração ( $T_{0h}$ ). Em contrapartida, as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> + cisteína e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram menores valores ( $P < 0,05$ ) após 24 horas de incubação ( $T_{24h}$ ), em relação ao  $T_{0h}$ , e as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína somente apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) do vigor após 36 horas de incubação ( $T_{36h}$ ).

A análise de integridade de membrana (Tabela 3) evidenciou, em cada tempo de incubação ( $T_{0h}$ ,  $T_{12h}$ ,  $T_{24h}$  e  $T_{36h}$ ), que não houve redução ( $P < 0,05$ ) do percentual de gametas com esta estrutura intacta. Considerando cada grupo experimental, constatou-se que apenas a diluição com ACP-105<sup>®</sup> + GPx + cisteína reduziu ( $P > 0,05$ ) o percentual de gametas com esta estrutura intacta durante 36 horas de incubação.

A análise de integridade de acrossoma (Tabela 4), considerando cada tempo de incubação, constatou que no  $T_{24h}$  as amostras diluídas em ACP-105<sup>®</sup> + cisteína

apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) percentual de gametas com acrossomas intactos do que as diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup>, e que no T<sub>36h</sub>, as amostras diluídas em ACP-105<sup>®</sup> + cisteína e ACP-105<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram maiores percentuais ( $P < 0,05$ ) de acrossomas íntegros do que as diluídas com Botu-sêmen<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx, ACP-105<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína. Considerando cada diluente, observou-se que as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) dos percentuais de gametas com acrossomas íntegros no T<sub>24h</sub>, em relação ao T<sub>0h</sub>. Em contrapartida, as amostras diluídas em ACP-105<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx, ACP-105<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram menores percentuais ( $P < 0,05$ ) no T<sub>36h</sub>, em relação ao T<sub>0h</sub>.

O potencial de membrana mitocondrial (Tabela 5), considerando cada tempo de avaliação, evidenciou diferença entre os diluidores apenas no T<sub>0h</sub>, com maiores percentuais ( $P < 0,05$ ) para as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> em comparação às diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína e ACP-105<sup>®</sup> + GPx + cisteína. Enquanto as análises de cada diluente evidenciou que as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx e Botu-sêmen<sup>®</sup> + GPx + cisteína apresentaram menores ( $P < 0,05$ ) percentuais de gametas com aPMM no T<sub>12h</sub> em relação ao T<sub>0h</sub>. Em contrapartida, as amostras diluídas em Botu-sêmen<sup>®</sup>, ACP-105<sup>®</sup>, Botu-sêmen<sup>®</sup> + cisteína e ACP-105<sup>®</sup> + cisteína apresentaram menores ( $P < 0,05$ ) percentuais no T<sub>24h</sub> em relação ao T<sub>0h</sub>, enquanto as amostras diluídas em ACP-105<sup>®</sup> + GPx e ACP-105<sup>®</sup> + GPx + cisteína somente apresentaram redução ( $P < 0,05$ ) destes percentuais no T<sub>36h</sub>, em relação ao T<sub>0h</sub>.

Na avaliação dos dados da cor relação de Pearson (Tabela 6) constatou-se alta correlação ( $p < 0,05$ ) da motilidade total com vigor e alto potencial de membrana mitocondrial, assim como do vigor com o alto potencial de membrana mitocondrial. Observou-se moderada correlação da motilidade total com a integridade de membrana; do vigor com a integridade de membrana; do alto potencial de membrana mitocondrial com a integridade de membrana e a integridade de acrossoma. Observou-se, ainda, que motilidade total e integridade de acrossoma, vigor e integridade de acrossoma e integridade de membrana e integridade de acrossoma apresentaram baixa correlação entre si.

Na avaliação dos grupos testados em relação aos tempos de refrigeração considerados, observou-se uma regressão dos valores de todos os parâmetros no decorrer do tempo (Figura 1). No entanto, os parâmetros de motilidade total e vigor

espermático, integridade de membrana e integridade de acrossoma no T<sub>12h</sub> e no T<sub>24h</sub>, não apresentaram diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre eles.

#### 4 DISCUSSÃO

A utilização de ACP-105, como diluente de sêmen eqüino, quando comparada ao do Equimix<sup>®</sup>, diluente comercial à base de leite como o botu-sêmen<sup>®</sup>, foi avaliada como viável, de acordo com Raphael (2007), que obteve resultados semelhantes na avaliação do sêmen fresco, adicionado deste diluente. Fato que, curiosamente difere dos obtidos neste estudo. No entanto, no decorrer dos momentos de avaliação Sobreira Neto (2008) também observou maior conservação da motilidade das células utilizando diluente à base de leite, em relação ao ACP, obtendo resultados inviáveis para utilização na IA, de acordo com os padrões estabelecidos pelo CBRA (1998), que preconiza valores mínimos de 25% de motilidade progressiva, o que também foi observado por Maia et al. (2010), ao compararem o uso de meio à base de leite com aquele à base de água de coco, e não obtiveram resultados satisfatório em relação ao uso da água de coco como diluente para sêmen equino.

A média dos resultados obtidos na avaliação do sêmen fresco (T<sub>0</sub>), não surpreendeu no que diz respeito aos parâmetros de integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade de acrossoma, considerando que neste momento a célula ainda não sofreu estresse oxidativo que, segundo Saleh e Agarwal (2002) e Ball (2008), tem início à medida que estes gametas são expostos a baixas temperaturas; além de ser indispensável algum tempo para que os espermatozoides produzam ROS e determinem estresse oxidativo.

O fato das amostras diluídas em botu-sêmen<sup>®</sup>, de maneira geral, não terem proporcionado maior preservação da MT diferem daqueles encontrados por Goulart (2004), que testou sêmen diluído com extensores à base de leite desnatado em 12, 24 e 48 horas de refrigeração e não observou diferença significativa entre os tempos. Este resultado pode ser explicado pelo fator individual do garanhão e por característica de boa refrigeração, que varia não só de acordo com o indivíduo, mas também com a raça e o período do ano (CARNEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2008).

Bilodeau et al. (2001) avaliaram o efeito da adição de glutathione e cisteína na preservação do sêmen bovino e concluíram que estes antioxidantes, quando utilizados em concentração acima de 0,5 mM, mantêm a motilidade alta por seis horas em diluente

à base de Tris-gema, o que está de acordo com os achados observados neste estudo que observou bons resultados na manutenção da motilidade e do vigor dos espermatozoides até o T<sub>12h</sub>, quando estas substâncias foram utilizadas no botu-sêmen®, e diferem dos encontrados por Foote et al. (2002), que adicionaram glutathione e outros antioxidantes ao diluente de sêmen bovino à base de leite. Estes pesquisadores afirmaram que esses antioxidantes não exerceram nenhum efeito benéfico na motilidade e na qualidade geral do sêmen, tendo atribuído este fato à presença da caseína, antioxidante natural encontrado em abundância no leite. Sinha et al. (1996) obtiveram aumento no percentual de motilidade espermática após a adição de 5 mM de glutathione ao sêmen caprino no período pós-descongelamento, em diluente à base de leite. No entanto, Atessahim et al. (2008), trabalhando com a mesma espécie, e Cajueiro et al. (2009), com a espécie ovina, não observaram aumento significativo da qualidade espermática pós-descongelamento, quando comparada ao grupo controle.

Sarlos et al. (2002) observaram que a adição de antioxidantes no sêmen de carneiros, dentre eles a GPx, prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade e reduz o grau de danos celulares. Os mesmos resultados favoráveis ao uso da GPx foram obtidos por Maxwell e Stojanov (1996) em sêmen ovino diluído em TRIS. No que diz respeito aos parâmetros de integridade da membrana plasmática e potencial da membrana mitocondrial, neste trabalho, não houve diferença do Botu-sêmen® comparado ao ACP, em todo tempo de avaliação. A dinâmica dos resultados se manteve, o que difere dos resultados obtidos pelos autores supracitados. Este fato pode ser explicado pelas características da espécie utilizada, bem como pelo fato de que os equinos, de um modo geral, não são selecionados por fertilidade, mas por desempenho individual, além de questões particulares como preferência por linhagens e características fenotípicas.

No que diz respeito à cisteína, pode-se observar que na concentração utilizada, mantém parâmetros semelhantes quanto ao grupo controle do ACP o que está de acordo com Severo (2009) que utilizou a cisteína no sêmen suíno refrigerado para inseminação artificial, e com Menezes et al. (2009) que estatisticamente também não observaram melhora no uso da cisteína, em relação ao grupo controle na conservação do sêmen ovino. Porém pode-se notar, numericamente, que a adição da cisteína no meio à base de leite (Botu-sêmen®), apresentou ação positiva à manutenção do vigor espermático em relação ao grupo controle de botu-sêmen (G1). Esta ação pôde ser obtida,

provavelmente, por sua ação antioxidante, que atuam protegendo as células dos danos provocados pelos ROS e evitando lesões celulares.

Silva et al. (2008), ao avaliarem outros antioxidantes adicionados ao sêmen de garanhões férteis e subférteis, não observaram eficácia relevante na adição de piruvato de sódio e trolox na proteção as mitocôndrias durante o processo de congelação/descongelação. Estes resultados corroboram com os obtidos no presente estudo, onde não se constatou resposta positiva na adição dos antioxidantes ao diluente convencional para sêmen eqüino, nem ao diluente a base de água de coco (ACP) em relação aos grupos controle. Silva et al. (2009) obtiveram resultado positivo na preservação da motilidade total e progressiva das células espermáticas submetidas à incubação a 37°C por 120 minutos em diluente para sêmen eqüino acrescido de 120 µM/mL de trolox, após a descongelação. Este resultado, provavelmente pôde ser observado pela maior exposição à injúria oxidativas sofridas pelo processo de congelação de sêmen que o processo de refrigeração, bem como pela ação diferenciada que cada antioxidante vai apresentar no meio diluente e sua interação coma a célula espermática.

Os melhores resultados obtidos neste estudo na avaliação da motilidade e vigor das células espermáticas de sêmen refrigerado de garanhões e da integridade de membrana foram obtidos nos grupos onde se utilizou a associação da GPx e da Cisteína isso se deve, provavelmente, à correlação que a cisteína apresenta com a glutathione peroxidase como afirma Menezes et al (2009) que diz que a cisteína participa da biosíntese da GPx, que, por sua vez atua na proteção contra o estresse oxidativo.

Um fato bastante curioso obtido neste trabalho foi o de que todos os grupos com ACP-105® apresentaram resultados superiores aos grupos onde se utilizou o Botu-Sêmen®, no que se refere aos valores de integridade do acrossoma. Uma possibilidade para tal fato pode estar relacionada com a técnica, onde o corante se ligaria as lectinas do leite, que estão disponíveis em grande quantidade nos diluentes à base de leite, não se ligando prioritariamente, ao acrossoma por uma questão de disponibilidade. Outra hipótese é o fato de a água de coco, segundo Barbier-Brygoo (1995), apresentar em sua composição o ácido 3-indol-acético (IAA), hormônio que atua no crescimento de vegetais, ligando-se a proteínas solúveis, o que poderia acarretar uma provável alteração do corante utilizado na técnica, já que o mesmo é de origem vegetal.

## 5 CONCLUSÕES

O uso da água do ACP-105® não se mostrou uma alternativa eficiente como diluente para sêmen eqüino, nem a fresco nem refrigerado, quando comparado ao Botu-sêmen®;

O uso de 5 U de glutathione peroxidase e 5 mM de cisteína apresenta benefício, quando utilizados em associação, no que se refere á manutenção da motilidade, vigor e integridade da membrana espermática quando utilizados com Botu-sêmen®;

O uso de diluentes à base de leite desnatado ainda é a melhor alternativa para sêmen eqüino. Contudo, estudos mais aprofundados do uso da água do ACP-105® e de diferentes concentrações e tipos de antioxidantes para sêmen desta espécie são de extrema necessidade.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa, **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 1137p.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BLUME, H.; MARQUES Jr, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 18, p. 97-104, 1994.

BATTELIER, F.; VIDAMENT, M.; FALQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, C.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 181-190, 2001.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.-A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-288, 2001.

CAJUEIRO, J.F.P.; SILVA, E.C.B.; VIDAL, A.H.; ALMEIDA, F.C.; BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeito da adição de trealose, taurina e cisteína ao sêmen criopreservado de ovinos. Recife. **Anais...** UFRPE, 2009. Disponível em [www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1113-1.pdf](http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1113-1.pdf). Acesso em 20 de março de 2010.

CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL- CBRA, **Manual para exame e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte:CBRA, 1998. 49p.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeito de diferentes períodos de equilíbrio e meios diluidores sobre o sêmen canino congelado e descongelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 470-471, 2001.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D. Efeito de três diferentes diluidores sobre o sêmen canino submetido a dois protocolos de descongelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n. 5, p. 372-380, 2005.

EDWARDS, J.J.; TOLLAKSEN, S.L.; ANDERSON, N.G. Protein of Human Semen. In: Two-Dimensional mapping of human seminal fluid. **Clinical Chemistry**, v. 73, p. 1335-1340, 1981.

FARIAS, J.O.; NUNES, J.F.; CARVALHO, M.A.M. et al. Avaliação “in vitro” e “in vivo” do sêmen de Tambaqui (*Colossoma macropomum* CUVIER) conservado à temperatura ambiente e criopreservado em água de coco. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 1, n. 1, p. 44-58, 1999.

FOOTE, R.H; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.

- FRANCL, A.T.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L. et al. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20°C. **Theriogenology**, v. 27, p. 517-524, 1987.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, p.97-110, 2004.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1697-1703, 2000.
- GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; McMANUS, C. et al. Efeitos da pentoxifilina sobre a viabilidade in vitro dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento a 5°C, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 112-122, 2004.
- GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v. 10, p. 156-170, 1994.
- LITTLE, T. M.; HILLS, F. J. Agricultural experimentation: design and analysis. New York: John Wiley, 1978. 350 p.
- MAIA, V.N.; CARNEIRO, G.F.; SILVA, S.V.; GOMES NETO, O.C.; ALMEIDA, F.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; DELL'AQUA JR., J.A.; GUERRA, M.M.P.

Equine sêmen extender without animal derived ingredients: Preliminary results. **Acta Scientia Veterinariae**. 38 (supl 2): s675-s821. P. s730, abstract 85. Anais, SBTE, 2010.

McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 1ed., Pennsylvania: Lea & Febizer, 1993. 1137p.

MELO, N.S.S. **Efeitos de diferentes concentrações de crioprotetores na congelação de sêmen eqüino**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2005)

MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y. et al. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, n.7, p. 1229-1235, 1997.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1013-1020, 1996.

MANNERVIK, B. **Methods in Enzymology: Glutathione peroxidase**. New York: Academic Press, 1985. 490 p.

MENEZES, E.S.B.; CAVALCANTE, J.M.M.; BRASIL, O.O. et al. Uso da N-acetilcisteína na conservação de sêmen ovino a 4 °C: Resultados preliminares. Disponível em [www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1243-1.pdf](http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R1243-1.pdf). 2008. Acesso em 18 de novembro de 2009.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULUS C.; PONTIKI, E.A. et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-212, 2007.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais Domésticos**. 6ed. Porto Alegre: Sulina 1987.

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

NAVARRO, J.; OBRADOR, E.; CARRETERO, J.; PETSCHEN, I.; AVIÑÓ, J.; PEREZ, P.; ESTRELA, J. M. Changes in glutathione status and the antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumour growth in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 410, 1999.

NEILD, D.M. **Evaluation of equine sperm membrane function: effects of cryopreservation.** 2005. 110f. Tese (Doutorado 2004) – Faculty of Veterinary Sciences, Utrecht University, Utrecht. 2005.

NUES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: I SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 1995, p. 53-63.

SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B. et al. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, p. 42-49, 2009.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n.11, p. 1287-1312, 2001.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 210-222, 1992.

PEÑA, A.I. **Flow cytometry in the assessment of fresh and frozen-thawed dog semen, and the effects of different cryopreservation methods on post-thaw sperm survival and longevity.** 2000. 46 f. Thesis (Doctoral) - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2000.

PICKETT, B.W. **Seminal extenders and cooled semen.** In: Equine Reproduction. McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Pennsylvania: Lea & Febizer, p. 746-754, 1993.

RAPHAEL, C.F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozóide equino refrigerado.** 2007. Dissertação (Mestrado da Universidade de São Paulo – USP, 2007)

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, p. 4480-4486, 1991.

SALGUEIRO, C.C.M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E. et al. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 377-378, 2003.

SALGUEIRO, C.C.M.; GONDIM, J.M.; NUNES, J.F. et al. Artificial insemination of sheep with semen extended on powder coconut water (ACP-102®), cooled and maintained at 4°C for 48 hours. 2004. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. Porto Seguro. **Proceedings...** Porto Seguro: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 374, 2004.

SAMPAIO NETO, J.C.; SALGUEIRO, C.C.M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J.F.. Utilização do diluente ACP-105 na refrigeração do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p. 137-139, 2002.

SARLOS, P. A. MOLNÁR, M. KÓKAI, Gy. GÁBOR and J. RÁTKY . Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, n. 2, p. 235-245, 2002.

SAS INSTITUT. SAS User's Guide: Statistical Analysis Systems Institute, Inc. Cary, 2000.

SEVERO,C.K. Avaliação da adição de cisteína no sêmen resfriado para inseminação em suíno. Disponível em [http://biblioteca.universia.net/html\\_bura/ficha/params/id/49066546.html](http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/id/49066546.html). 17-oct-2009.

SMILEY, S.T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic JC-1. **Cell Biology**, v. 88, p. 3671-3675, 1991.

SMITH, J.F.; MURRAY, G.R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, p. 246-250, 1997.

SOBREIRA NETO, J.A. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP105) e refrigerada a 5 C°**. Dissertação de mestrado-Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, D.K. et al. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n. 9 p. 3-36, 1999.

TALBOT, P.; SUMMERS, R. G.; HYLANDER, B. L. et al. The role of calcium in the acrosome reaction: an analysis using ionophore A23187. **Journal of Experimental Zoology**, v. 198, n. 3, p. 383-392, 1976.

TONIOLLI, R.; MESQUITA, D.S.M. Fertilidade de porcas inseminadas com sêmen diluído em água de coco estabilizada e com B.T.S. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, p. 249-254, 1990.

UCHOA, D.C.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Inseminação artificial a fresco em cadelas da raça Boxer com diferentes diluidores de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl., n. 5, p. 150-152, 2002.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S. et al. Utilização de um container modelo CELLE modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 505-514, 1999.

Van OVERVELD, F.W.P.C.; HAENEN, G.R.M.M.; RHEMREV, J. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico-Biological Interactions**, v. 127, p. 151-161, 2000.

ZEGINIADOU, T.; PAPADIMAS, J.; MANTALENAKIS, S. Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance. **Andrologia**, v. 32, n. 9, p. 335-343, 2000.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v. 55, n. 6, p. 922-926, 2000.

Tabela 1 – Média geral  $\pm$  desvio padrão da motilidade total (%) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T<sub>0h</sub>, T<sub>12h</sub> e T<sub>24h</sub>) e 18 °C (T<sub>36h</sub>)

Grupos Experimentais	Tempo de incubação			
	T <sub>0h</sub>	T <sub>12h</sub>	T <sub>24h</sub>	T <sub>36h</sub>
Botu-Sêmen®	65,00 $\pm$ 13,48 <sub>Aa</sub>	48,75 $\pm$ 15,39 <sub>Aac</sub>	35,00 $\pm$ 21,21 <sub>ABbc</sub>	18,33 $\pm$ 15,57 <sub>Ab</sub>
ACP-105®	47,50 $\pm$ 15,74 <sub>Aa</sub>	17,08 $\pm$ 14,05 <sub>ABbc</sub>	7,08 $\pm$ 9,40 <sub>BCb</sub>	3,33 $\pm$ 5,77 <sub>BCbc</sub>
Botu-Sêmen® + GPx	64,58 $\pm$ 15,29 <sub>Aa</sub>	42,08 $\pm$ 26,41 <sub>ABbcd</sub>	33,75 $\pm$ 20,90 <sub>ABCcd</sub>	22,08 $\pm$ 16,16 <sub>Ad</sub>
ACP-105® + GPx	54,58 $\pm$ 17,12 <sub>Aa</sub>	36,00 $\pm$ 22,71 <sub>ABa</sub>	36,25 $\pm$ 22,58 <sub>ABa</sub>	17,50 $\pm$ 15,30 <sub>ABb</sub>
Botu-Sêmen® + Cist	56,25 $\pm$ 16,67 <sub>Aa</sub>	18,33 $\pm$ 13,54 <sub>ABbc</sub>	14,17 $\pm$ 14,59 <sub>ABCbc</sub>	3,33 $\pm$ 4,92 <sub>BCbd</sub>
ACP-105® + Cist	44,17 $\pm$ 17,03 <sub>Aa</sub>	8,33 $\pm$ 6,51 <sub>Bb</sub>	4,58 $\pm$ 4,98 <sub>C<sup>b</sup></sub>	0,83 $\pm$ 1,95 <sub>Cb</sub>
Botu-Sêmen®+ GPx + Cist	57,08 $\pm$ 18,64 <sub>Aa</sub>	49,58 $\pm$ 18,40 <sub>Aac</sub>	39,58 $\pm$ 20,50 <sub>Aa</sub>	21,67 $\pm$ 15,28 <sub>ABd</sub>
ACP-105®+ GPx + Cist	48,75 $\pm$ 15,09 <sub>Aa</sub>	23,75 $\pm$ 10,25 <sub>ABbc</sub>	13,33 $\pm$ 12,12 <sub>ABCb</sub>	3,75 $\pm$ 6,08 <sub>BCbd</sub>

Cist = cisteína; Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam P<0,05; letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam P<0,05.

Tabela 2 – Média geral  $\pm$  desvio padrão do vigor (0-5) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T<sub>0h</sub>, T<sub>12h</sub> e T<sub>24h</sub>) e 18 °C (T<sub>36h</sub>)

Grupos Experimentais	Tempo de incubação			
	T <sub>0h</sub>	T <sub>12h</sub>	T <sub>24h</sub>	T <sub>36h</sub>
Botu-Sêmen®	3,33 $\pm$ 0,49 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	3,17 $\pm$ 0,39 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	2,67 $\pm$ 0,98 <sub>ABC</sub> <sup>a</sup>	1,92 $\pm$ 1,00 <sub>ABCD</sub> <sup>b</sup>
ACP-105®	3,25 $\pm$ 0,75 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 0,83 <sub>B</sub> <sup>b</sup>	1,42 $\pm$ 1,00 <sub>BC</sub> <sup>c</sup>	0,58 $\pm$ 0,90 <sub>CD</sub> <sup>c</sup>
Botu-Sêmen® + GPx	3,50 $\pm$ 0,67 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 1,13 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	3,00 $\pm$ 1,13 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	2,17 $\pm$ 1,11 <sub>ABC</sub> <sup>b</sup>
ACP-105® + GPx	3,50 $\pm$ 0,67 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	3,33 $\pm$ 0,65 <sub>AB</sub> <sup>b</sup>	3,42 $\pm$ 0,67 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	2,42 $\pm$ 1,16 <sub>AB</sub> <sup>bc</sup>
Botu-Sêmen® + Cist	3,50 $\pm$ 0,90 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	2,42 $\pm$ 0,90 <sub>AB</sub> <sup>ad</sup>	2,08 $\pm$ 1,16 <sub>ABC</sub> <sup>bd</sup>	0,92 $\pm$ 1,16 <sub>BCD</sub> <sup>c</sup>
ACP-105® + Cist	3,42 $\pm$ 0,79 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	2,25 $\pm$ 0,87 <sub>B</sub> <sup>b</sup>	1,58 $\pm$ 1,51 <sub>BC</sub> <sup>bc</sup>	0,33 $\pm$ 0,89 <sub>D</sub> <sup>d</sup>
Botu-Sêmen®+ GPx + Cist	3,67 $\pm$ 0,78 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	3,58 $\pm$ 0,51 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	3,50 $\pm$ 0,52 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	2,83 $\pm$ 0,94 <sub>A</sub> <sup>b</sup>
ACP-105®+ GPx + Cist	3,58 $\pm$ 0,67 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	2,92 $\pm$ 0,79 <sub>AB</sub> <sup>ab</sup>	2,25 $\pm$ 1,14 <sub>ABC</sub> <sup>bc</sup>	1,25 $\pm$ 1,54 <sub>ABCD</sub> <sup>c</sup>

Cist = cisteína; Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam P<0,05; letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam P<0,05.

Tabela 3 – Média geral  $\pm$  desvio padrão da integridade de membrana (%) em espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T<sub>0h</sub>, T<sub>12h</sub> e T<sub>24h</sub>) e 18 °C (T<sub>36h</sub>)

Grupos Experimentais	Tempo de incubação			
	T <sub>0h</sub>	T <sub>12h</sub>	T <sub>24h</sub>	T <sub>36h</sub>
Botu-Sêmen®	61,17 $\pm$ 14,90 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	61,29 $\pm$ 9,65 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	60,08 $\pm$ 9,39 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	49,13 $\pm$ 12,94 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
ACP-105®	64,83 $\pm$ 10,04 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	55,83 $\pm$ 18,51 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	51,79 $\pm$ 20,64 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	46,54 $\pm$ 24,26 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Botu-Sêmen® + GPx	69,25 $\pm$ 14,94 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	62,38 $\pm$ 14,81 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	57,79 $\pm$ 15,66 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	60,21 $\pm$ 13,22 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
ACP-105® + GPx	59,08 $\pm$ 11,53 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	63,08 $\pm$ 17,84 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	62,75 $\pm$ 14,47 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	55,50 $\pm$ 19,34 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Botu-Sêmen® + Cist	67,54 $\pm$ 15,90 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	56,00 $\pm$ 16,66 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	44,67 $\pm$ 23,20 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	47,88 $\pm$ 27,27 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
ACP-105® + Cist	65,58 $\pm$ 12,10 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	57,25 $\pm$ 24,20 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	48,42 $\pm$ 25,23 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	51,08 $\pm$ 27,88 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Botu-Sêmen®+ GPx + Cist	66,67 $\pm$ 13,86 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	66,17 $\pm$ 16,68 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	59,50 $\pm$ 7,61 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	70,42 $\pm$ 20,25 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
ACP-105®+ GPx + Cist	63,75 $\pm$ 10,44 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	56,88 $\pm$ 19,15 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	37,50 $\pm$ 19,70 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	57,25 $\pm$ 24,69 <sub>A</sub> <sup>a</sup>

Cist = cisteína; Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam P<0,05; letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam P<0,05.

Tabela 4 – Média geral  $\pm$  desvio padrão da integridade de acrossomas (%) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T<sub>0h</sub>, T<sub>12h</sub> e T<sub>24h</sub>) e 18 °C (T<sub>36h</sub>)

Grupos Experimentais	Tempo de incubação			
	T <sub>0h</sub>	T <sub>12h</sub>	T <sub>24h</sub>	T <sub>36h</sub>
Botu-Sêmen®	33,00 $\pm$ 19,43 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	20,79 $\pm$ 16,23 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	13,83 $\pm$ 5,86 <sub>B</sub> <sup>b</sup>	4,50 $\pm$ 3,75 <sub>B</sub> <sup>bc</sup>
ACP-105®	38,96 $\pm$ 15,80 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	28,38 $\pm$ 10,05 <sub>A</sub> <sup>ab</sup>	31,67 $\pm$ 14,61 <sub>AB</sub> <sup>ab</sup>	16,75 $\pm$ 8,04 <sub>AB</sub> <sup>bc</sup>
Botu-Sêmen® + GPx	29,58 $\pm$ 14,30 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	22,33 $\pm$ 12,57 <sub>A</sub> <sup>ab</sup>	17,63 $\pm$ 17,88 <sub>AB</sub> <sup>ab</sup>	7,75 $\pm$ 5,83 <sub>B</sub> <sup>b</sup>
ACP-105® + GPx	30,96 $\pm$ 19,12 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	25,83 $\pm$ 17,38 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	15,67 $\pm$ 14,00 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	12,67 $\pm$ 8,54 <sub>B</sub> <sup>b</sup>
Botu-Sêmen® + Cist	34,83 $\pm$ 15,87 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	30,88 $\pm$ 14,07 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	30,17 $\pm$ 14,16 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	17,33 $\pm$ 8,21 <sub>AB</sub> <sup>b</sup>
ACP-105® + Cist	39,83 $\pm$ 20,98 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	38,83 $\pm$ 15,83 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	37,75 $\pm$ 15,91 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	29,08 $\pm$ 16,12 <sub>A</sub> <sup>a</sup>
Botu-Sêmen®+ GPx + Cist	36,83 $\pm$ 17,41 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	23,58 $\pm$ 12,57 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	16,42 $\pm$ 15,54 <sub>AB</sub> <sup>b</sup>	8,00 $\pm$ 7,79 <sub>B</sub> <sup>cd</sup>
ACP-105®+ GPx + Cist	40,33 $\pm$ 14,38 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	39,29 $\pm$ 20,03 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	33,25 $\pm$ 16,83 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	29,58 $\pm$ 15,69 <sub>A</sub> <sup>a</sup>

Cist = cisteína; Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam P<0,05; letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam P<0,05.

Tabela 5 – Média geral  $\pm$  desvio padrão do potencial de membrana mitocondrial (%) de espermatozoides eqüinos diluídos em Botu-Sêmen® ou ACP-105®, suplementados com GPx (5 U) e ou Cisteína (5 mM), após incubação a 14 °C (T<sub>0h</sub>, T<sub>12h</sub> e T<sub>24h</sub>) e 18 °C (T<sub>36h</sub>)

Grupos Experimentais	Tempo de incubação			
	T <sub>0h</sub>	T <sub>12h</sub>	T <sub>24h</sub>	T <sub>36h</sub>
Botu-Sêmen®	79,25 $\pm$ 11,51 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	64,71 $\pm$ 10,65 <sub>A</sub> <sup>abc</sup>	45,08 $\pm$ 26,19 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	49,92 $\pm$ 20,66 <sub>A</sub> <sup>c</sup>
ACP-105®	76,29 $\pm$ 11,87 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	55,79 $\pm$ 20,89 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	45,50 $\pm$ 22,74 <sub>A</sub> <sup>b</sup>	41,29 $\pm$ 28,96 <sub>A</sub> <sup>b</sup>
Botu-Sêmen® + GPx	73,58 $\pm$ 11,98 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	65,50 $\pm$ 15,34 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	57,75 $\pm$ 22,14 <sub>A</sub> <sup>c</sup>	44,38 $\pm$ 26,36 <sub>A</sub> <sup>b</sup>
ACP-105® + GPx	69,46 $\pm$ 19,87 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	71,42 $\pm$ 7,14 <sub>A</sub> <sup>ac</sup>	58,63 $\pm$ 19,97 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	40,13 $\pm$ 22,05 <sub>A</sub> <sup>bd</sup>
Botu-Sêmen® + Cist	70,46 $\pm$ 13,18 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	63,08 $\pm$ 15,23 <sub>A</sub> <sup>ab</sup>	48,25 $\pm$ 23,24 <sub>A</sub> <sup>bd</sup>	31,46 $\pm$ 25,71 <sub>A</sub> <sup>ce</sup>
ACP-105® + Cist	71,96 $\pm$ 13,85 <sub>AB</sub> <sup>a</sup>	53,33 $\pm$ 16,41 <sub>A</sub> <sup>ab</sup>	47,13 $\pm$ 18,98 <sub>A</sub> <sup>bc</sup>	38,42 $\pm$ 19,59 <sub>A</sub> <sup>c</sup>
Botu-Sêmen®+ GPx + Cist	65,46 $\pm$ 10,48 <sub>B</sub> <sup>a</sup>	62,92 $\pm$ 8,68 <sub>A</sub> <sup>cd</sup>	56,79 $\pm$ 23,68 <sub>A</sub> <sup>cd</sup>	44,83 $\pm$ 23,50 <sub>A</sub> <sup>bd</sup>
ACP-105®+ GPx + Cist	63,88 $\pm$ 13,74 <sub>B</sub> <sup>a</sup>	59,67 $\pm$ 14,02 <sub>A</sub> <sup>ac</sup>	45,96 $\pm$ 19,07 <sub>A</sub> <sup>a</sup>	35,46 $\pm$ 20,59 <sub>A</sub> <sup>bd</sup>

Cist = cisteína; Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam P<0,05; letras maiúsculas distintas na mesma coluna indicam P<0,05.

Tabela 6 – Coeficiente de correlação de Pearson entre variáveis do sêmen de equinos, antes e após a refrigeração, com e sem adição de substâncias antioxidantes

	Vigor	aPMM	IM	IAC
Motilidade	r = 0,83022 p<0,0001	r = 0,70658 p<0,0001	r = 0,39448 p<0,0001	r = 0,15830 0,0743
Vigor		r = 0,70357 p<0,0001	r = 0,39356 p>0,0001	r = 0,16194 0,0678
aPMM			r = 0,47289 p<0,0001	r = 0,34340 p<0,0001
IM				r = 0,13976 0,1156

aPMM= alto potencial de membrana mitocondrial; IM = integridade de membrana; IAC= integridade de acrossoma.

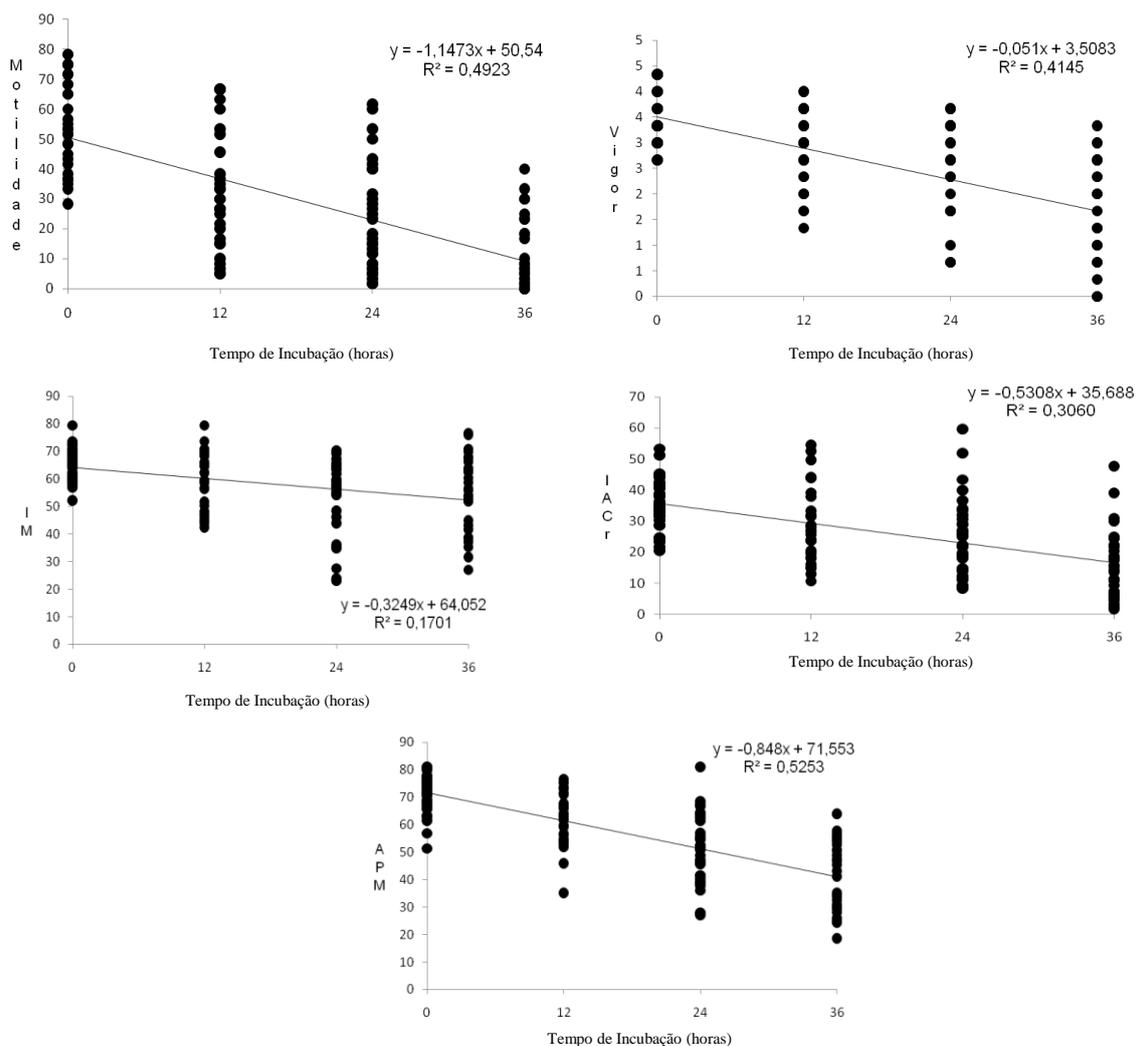


Figura 1– Representações gráficas da análise de regressão, em função dos tempos de incubação, dos parâmetros de motilidade, vigor, integridade de membrana (IM) e de acrossoma (IAC), e alto potencial de membrana mitocondrial (APMM) de espermatozoides eqüinos, antes e após a refrigeração, adicionados ou não com diferentes antioxidantes.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diante dos resultados avaliados e obtidos neste estudo, fica clara a necessidade de se realizar mais estudos em relação à ação do ACP-105® como diluente para sêmen eqüino, bem como é fundamental que mais estudos sejam realizados em relação ao uso de antioxidantes, isolados e associados, nos diluentes para sêmen, pois obtivemos claros sinais que estes podem ser uma boa alternativa no que se refere à melhoria da qualidade e da viabilidade de sêmen eqüino refrigerado. Outro ponto fundamental é a relativa limitação de tempo de transporte do sêmen equino já que o sistema de refrigeração utilizado não mantém a temperatura constante por mais de 24 horas o que, em algumas localidades, pode ser um fator limitante já que a demanda por sêmen equino nesta condição é uma crescente.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)