



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CAMPUS II
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

RODRIGO ALVES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE
ESPERMATOZOIDES DE JUMENTO (*Equus asinus*)**

AREIA

2020

RODRIGO ALVES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE
ESPERMATOZOIDES DE JUMENTO (*Equus asinus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

AREIA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M775a Monteiro, Rodrigo Alves.

Avaliação das práticas de criopreservação sobre
espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*) / Rodrigo
Alves Monteiro. - Areia, 2020.

74 f. : il.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva, Carlos Enrique
Pena Alfaro.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Asininos. 2. Biotecnologias. 3. Reprodução. 4.
Sêmen. I. Silva, Sildivane Valcácia. II. Pena Alfaro,
Carlos Enrique. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

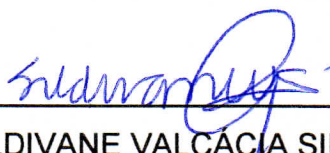
RODRIGO ALVES MONTEIRO

**AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE
ESPERMATOZOIDES DE JUMENTO (EQUUS ASINUS)**

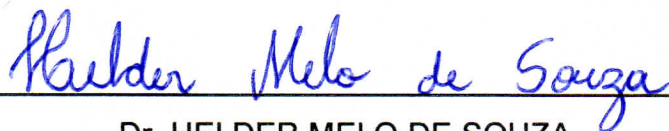
Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do Brejo
Paraibano.

APROVADA EM 27/02/2020

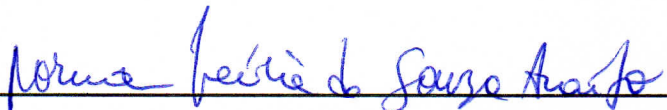
BANCA EXAMINADORA



Dra. SILDIVANE VALCÁCIA SILVA
UFPB
Orientador



Dr. HELDER MELO DE SOUZA
Examinador



Dra. NORMA LÚCIA DE SOUZA ARAÚJO
Examinador

*Deus pai todo poderoso,
criador de todas as coisas!*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo e de todos! Por ser meu alfa e meu ômega. Presente nos momentos difíceis, fáceis, bons e ruins, nas aflições e nas bem-aventuranças. Por todas as provas, dádivas, força, benevolência e conquistas. Não me canso de agradecer ao Senhor! Entrega o teu caminho ao Senhor; confia nEle, e Ele tudo fará. OBRIGADO MEU DEUS!

Agradecer a minha orientadora Professora Dra. Sildivane Silva, pela confiança, preocupação, ensinamentos e dedicação nesse nosso projeto. Obrigado de coração!

Agradecer ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UFPB (PPGCAn) pela oportunidade e para desenvolver esse trabalho, ao Hospital Veterinário da UFCG Campus Patos, Laboratório de Reprodução Animal da UFCG (LACRA) e ao Laboratório de Andrologia Animal da UFRPE (ANDROLAB).

Agradecer aos meus pais que viram de perto minha dedicação e empenho nesse trabalho, que me viam acordar de 5h da manhã para tirar capim, que ficaram ansiosos quando eu chegava tarde em casa congelando sêmen, ficando apreensivos quando eu virava noite escrevendo e que sempre estiveram comigo desde do dia que recebi a notícia que passei seleção até hoje. Espero ser motivo de orgulho para eles.

Agradecer ao meu coorientador, Professor Dr. Carlos Peña, por todas as oportunidades, confiança, dedicação, ensinamentos e experiências acadêmicas e de vida. Um cara que além de um dos grandes nomes da reprodução animal do Brasil, uma verdadeira lenda, é uma inspiração como pessoa, que sempre esteve de coração aberto a ajuda sem medir esforços. Muito obrigado Carlos!

Agradecer a um amigo e irmão que ganhei nesse mestrado, Professor Dr. Valdir Moraes. Agradeço por tudo desde do início, pelos momentos de descontração, pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos. Lembro da forma cordial que você me recebeu na sua sala e disponibilizou uma equipe de estagiários para ajudar nesse projeto.

Agradecer a equipe do laboratório de Reprodução Animal de Patos, é impossível e injusto citar os nomes de todos que me ajudaram nessa batalha, mas não poderia deixar de citar o nome de uma pessoa que foi meu alicerce nesse mestrado, Rodolfo Cunha, lembro e cito aqui a dedicação, empenho, disciplina e a forma que abraçou esse trabalho. Além de um colega, é um amigo-irmão, que ganhei para vida. Valeu Major tamos juntos! Agradecer a Luana Batista e aos amigos Sarhanna Dantas e Roberto Matheus duas joias que Deus me presenteou nesse mestrado, obrigado meninos.

Agradecer a coordenação da PPGCAn em nome do Prof. Dr. Ricardo Lucena, coordenador do curso em especial ao secretário Jozenio Souza, um cara excepcional que sempre esteve disposto a ajudar sem medir esforços.

Agradecer aos participantes da banca Profa Dra. Normal Lucia, eu tenho a maior satisfação e orgulho de dizer que foi aluno da senhora. Tenho muito agradecer a senhora pela sua contribuição na minha formação como médico veterinário. Em 12 de abril de 2009 a estávamos participando da minha defesa de monografia, hoje 27 de fevereiro de 2020, estamos aqui se reencontrando para defesa do meu mestrado. Muito obrigado, professora.

Agradecer ao Dr Helder Melo pela disponibilidade de estar hoje aqui contribuindo para as melhorias desse trabalho. É uma honra imensa ter um dos grandes nomes da reprodução equina da Paraíba fazendo parte dessa banca. Muito obrigado por ter aceito nosso convite.

E não poderia de deixar de agradecer aos equídeos, (jumentos, equinos e muares), animais que sempre estiveram presentes na minha vida desde do burro Xexeú, do meu pai, passando pela égua Neblina (égua que contribuiu nos meus conhecimentos de reprodução equina), passando por Esmeralda (jumenta manequim do projeto), Neymar, Celestino e Obama Bin Laden (doadores de sêmen do projeto). Tudo que conquistei até hoje foram graça a esses animais.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

*Don't study because you need to.
Study because knowledge is power.
Study because they can never take
it away from you. Study because
want to know more. Study because
it enhances you. Study because it
grows you.*

Autor desconhecido

RESUMO

A maioria das técnicas utilizadas para criopreservação de sêmen em asininos são adaptações de outras espécies, a espécie equina servindo de base para essas práticas. Portanto, o desenvolvimento de técnicas de criopreservação, voltadas exclusivamente para jumentos, é uma necessidade na reprodução desses animais. Baseado nisso o objetivo desse estudo foi avaliar as técnicas de remoção do plasma seminal e os métodos de congelamento de sêmen na espécie asinina (*Equus asinus*), preconizando protocolos aplicáveis à rotina de campo. Foram testados dois métodos de remoção do PM, centrifugação e filtração, e os sistemas de congelamento, automatizado e convencional. Foram usados três machos adultos, saudáveis. Para as colheitas de sêmen foi utilizado o método de vagina artificial, totalizando 18 ejaculados aprovados, compreendendo seis ejaculados por cada animal. Após as colheitas e remoção da fração gel, o sêmen foi previamente diluído (1:1; sêmen:diluidor). O sêmen, então, foi dividido em duas partes, uma submetida ao filtro de membrana comercial (SpermFilter®), a outra parte submetida à centrifugação (600 x g por 10 minutos). Para os métodos de congelamento foram usados o sistema convencional (geladeira 5 °C/rampa em caixa de isopor) e o sistema automatizado (TK-3000®, curva P2S2). Assim, formou-se os grupos: centrifugado automatizado (MC), filtrado automatizado (MF), centrifugado convencional (RC) e filtrado convencional (RF). Foram realizadas análises subjetivas no sêmen fresco, (motilidade, vigor, concentração, pH, morfologia e integridade de membrana plasmática) e pós-descongelamento (cinética espermática, integridade de membranas plasmática e mitocondrial). Os dados foram submetidos à avaliação estatística (teste de normalidade, ANOVA e pós-teste de Tukey, com nível de significância de 5%). Os animais foram avaliados individualmente e após a constatação que não houve diferença entre os indivíduos, os dados foram agrupados por grupo experimental formado. Foi constatado que os grupos submetidos à técnica de filtração apresentaram maior recuperação espermática ($P<0,05$) que os centrifugados. Nos demais parâmetros (morfologia espermática, integridade e funcionalidade de membrana) não foi observada ($P>0,05$) distinção entre os grupos experimentais. Foi observado que o grupo RF apresentou menor ($P<0,05$) motilidade progressiva e velocidade curvilínea que os demais grupos testados. Conclui-se que o método centrifugação é o mais indicado para espécie asinina. O método de congelamento automatizado, em jumentos, se apresentou mais seguro e constante na redução da temperatura, o método convencional pode ser uma alternativa desde de que realizado na curva rápida.

Palavras-chave: Cinética. Congelamento. Integridade celular. Plasma seminal. Sêmen.

ABSTRACT

The most reproduction techniques used in donkeys are adaptations on other species, the equine are the base for these practices. Therefore, the development in practice of cryopreservation directed by asses is necessary. Based this, the aim in this study was assess the perform on removing the seminal plasma (SP) and evaluate methods of freezing semen in donkeys (*Equus asinus*), establish news protocols for the field routine is important. Were evaluated two methods of removal SP, centrifugation and filtration, and the freezing systems, automated and conventional. Three jackass, healthy, were used. By collections, was used artificial vagina method, sets are six ejaculates for each jackass. After the collections and free gel, the semen was divided in two parts, submitted to commercial membrane filter (SpermFilter®), another part subjected by centrifugation (600xg for 10 minutes). In order to freezing methods, the conventional system used (refrigerator 5 °C/ ramp in storyfoam box) and the automated system (TK-3000®, curve P2S2) were used. Thus were groups formed: automated centrifuged (MC), automaed filtrate (MF), conventional centrifuged (RC) and completed conventional filtrate (RF). Subjective analyzes were performed on fresh semen (motility, vigor, concentration, pH, morphology and integrity of membrane). The data were submitted to statistics evaluation (normality test, ANOVA, post test Turkey with 5% significance). The animals were evaluated individually and after finding that there was no difference between individuals, the data were grouped by formed experimental group. It was found that the groups submitted to the filtration technique showed greater sperm recovery ($P<0.05$) than the centrifuged ones. Found that groups submitted to the filtration technique showed great recovery ($P<0.05$) than the centrifugation groups. Other parameters (sperm morphology, membrane integrity and functionality) there was no difference ($P>0.05$) between the experimental groups. It was observed that the RF group had lower ($P<0.05$) progressive motility and curvilinear speed than the other groups tested. In conclusion, the centrifugation is the best technique to remove SP in donkeys. The method automated freezing, in donkeys, proved to be safer and more constant in reducing the temperature, the conventional method can be an alternative since performed on the fast curve.

Keywords: Freezing. Cells integrity. Kinetics. Seminal plasma. Sperm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Comportamento de eliminação de fezes/urina e marcação territorial equina...	19
Figura 2 -	Macho asinino realizando procura, reflexo flehmen, cobrindo com fezes e urinando para demarcar território.....	19
Figura 3 -	Diagrama representativo da membrana plasmática celular.....	22
Figura 4 -	Sistema computadorizado de análise espermática.....	36
Figura 5 -	Trajectoria espermática avaliada pelo sistema CASA.....	36
Figura 6 -	Representação gráfica dos diferentes parâmetros cinéticos avaliados pelo sistema computadorizado de análise espermática.....	36
Figura 7 -	Teste de integridade de membrana plasmática pela dupla coloração eosina-nigrosina.....	38
Figura 8 -	Teste hiposmótico.....	39
Figura 9 -	Sêmen de jumento corado com sondas fluorescentes.....	40
Figura 10 -	Sonda fluorescente 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimi-dazolil carbocianina (JC-1)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros espermáticos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento fresco e descongelado submetidos a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação.....	72
Tabela 2 -	Parâmetros cinéticos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento descongelado e submetido a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação.....	72
Tabela 3 -	Parâmetros velocimétricos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento descongelado e submetido a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação.....	72
Tabela 4 -	Integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento descongelado e submetido a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação.....	73
Tabela 5 -	Análise comparativa (média $\pm$ desvio padrão) entre as técnicas de avaliação de integridade de membrana plasmática de sêmen de jumento criopreservado por dupla coloração simples (eosina-nigrosina) e dupla coloração por fluoróforos (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo).....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ATP	Adenosina Trifosfato
BCF	Frequência do Batimento de Flagelo
CASA	Sistema computadorizado de avaliação espermática
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
COX-	Ciclo-oxigenase
CLC	Ciclodextrina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMF	Dimetilformamida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino treta-acético
EYCE	Egg Yolk-Coagulating enzyme
FOA	Food and Agriculture Organization
GLY	Glicerol
HOST	Teste Hiposmótico
IA	Inseminação Artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
iMT	Integridade de Membrana
IgA	Imunoglobulina A
INRA	Institut national de la recherche agronomique
IP	Iodeto de Propídeo
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' tetracoloro -1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolil
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDF	Fração de Baixa Densidade
LIN	Linearidade
MP	Motilidade Progressiva
MITO	MitoTracker
MT	Motilidade Total
PBS	Tampão fosfato salina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Potencial Mitocondrial
PMN	Neutrófilos Polimorfonucleares

R123	Rodamina 123
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
STR	Retilinearidade
TK	Tecnologia em Congelação
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
VAP	Velocidade da Trajetória
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Linear Progressiva
WOB	Índice de Oscilação

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
<	Menor que
+	Mais
±	Mais ou menos
10 ⁶	Milhões
10 ⁹	Bilhões
N ₂	Nitrogênio
H	Hora
Min	Minuto
S	Segundo
g/min	Força g por minuto
mL	Mililitros
G	Gramas
kg	Quilogramas
Kcal	Quilocalorias
Mg	Miligrama
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
Cm	Centímetro
~	Proximidade
®	Marca Registrada
≤	Menor ou igual
mm ³	Milímetros cúbicos
cm ³	Centímetros cúbicos
mOsm	Osmolaridade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
	2.1 Objetivo Geral.....	17
	2.2 Objetivo Específicos.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
	3.1 Comportamento Reprodutivo nos Equídeos.....	18
	3.2 O Espermatozoide Asinino.....	20
	3.3 Importância do Plasma Seminal nos Asininos.....	23
	3.4 Princípios da Criopreservação.....	27
	3.5 Congelação de Sêmen de Equídeos.....	29
	3.6 Crioprotetores usados na congelação de sêmen de asininos.....	30
	3.7 Curvas de refrigeração e congelação.....	32
	3.8 Técnicas de Avaliação de Sêmen.....	34
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
5	ARTIGO: Avaliação das Práticas de Criopreservação sobre Espermatozoides de Jumentos (<i>Equus asinus</i>).....	53
	APÊNDICE A – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DA CEUA/UFPB.....	74

1 INTRODUÇÃO

A criação de equídeos desempenha importante função na economia das comunidades rurais, atuando como fonte de renda complementar ao homem do campo. A população mundial de asininos atingiu cerca de 44 milhões de animais (FAO, 2016) e o Brasil tem uma posição de destaque nesta criação mundial, com um rebanho de cerca de 376.884 mil cabeças (IBGE, 2017). O Brasil, por conseguinte, tem o maior rebanho asinino da América do Sul, no entanto, nas últimas décadas este rebanho tem sido reduzido (CARNEIRO; BARROS, 2018). Entre o último censo agropecuário, publicado em 2017 (IBGE, 2017) e o censo agropecuário de 2015 (registro de 654.712 mil cabeças; IBGE, 2015), foi percebida uma redução de 277.828 mil animais em dois anos.

Esta redução pode ser justificada pela substituição deste animal por motocicletas e máquinas agrícolas, uma vez que estes animais são comumente utilizados para este fim nas criações. Os asininos têm sido a espécie de produção pecuária que mais sofreu com esses impactos. No Nordeste brasileiro grande parte dos animais, não são mais usados nas atividades rurais, são abandonados nas rodovias podendo causar diversos acidentes de trânsito, sendo considerado um grande problema social (CARNEIRO; BARROS, 2018). Portanto é necessário contornar esses problemas e criar possibilidades viáveis para pequenos e médios produtores rurais do semiárido nordestino. Na Europa, por exemplo, existe um trabalho intenso com o intuito da preservação do material genético desses animais. A mecanização agrícola e o êxodo rural no século vinte contribuiu para a redução de cerca de 80% da população de jumentos no continente europeu (CAMILO *et al.*, 2017).

O Brasil, diferentemente de buscar resgatar o uso deste animal na pecuária e atividades rurais, tornou-se um grande exportador de carne asinina para países asiáticos. A carne de jumento foi reconhecida como um alimento nutritivo para o consumo humano com proteínas, vitaminas e minerais de alta qualidade. A carne de jumentos jovens possui aminoácidos essenciais e uma porcentagem significativa de ácidos graxos insaturados, sendo de alto valor nutricional (CAMILLO *et al.*, 2018).

Outra alternativa para a asininocultura seria o uso do leite de jumenta, produto usado como alternativa econômica para os pequenos e médios produtores rurais na região do Mediterrâneo da Europa, que pode ser usado tanto na alimentação humana quanto na fabricação de cosméticos. Na Itália, 40% da produção de leite de jumenta é destinada ao

consumo humano e 60% para a produção de cosméticos. O leite de jumenta possui grande similaridade com o leite humano, sendo recomendado para indivíduos que apresentam hipersensibilidade as proteínas do leite bovino (CAMILLO *et al.*, 2018).

Para o aumento de produtos de origem asinina se faz necessário o uso do melhoramento genético nessa espécie. As biotecnologias da reprodução desempenham um papel fundamental no desenvolvimento científico, social e econômico da sociedade. Dentre as contribuições podemos destacar a multiplicação e seleção genética de indivíduos superiores em um curto espaço de tempo, formação de bancos de germoplasma, manutenção da genética de animais ou linhagens ameaçadas de extinção (FIGUEIREDO; MOLENTO, 2008).

Dentre as mais importantes biotécnicas da reprodução, tem-se a congelação de gametas masculinos. Com a descoberta do glicerol, em meados de 1940 por Polge, houve melhora significativa na congelação espermática, por proporcionar ação protetora nos espermatozoides, até então desconhecidas pelos pesquisadores. A criopreservação encontra-se consolidada na espécie bovina, entretanto em outras espécies como ovinos, caprinos, suínos, bubalinos, equinos e principalmente asininos, ainda há necessidade de aperfeiçoamento da técnica (OHASHI; BARUSELLI, 2008).

Ainda há desconhecimento quanto as biotécnicas aplicadas na espécie asinina. Poucos são os estudos sobre a criopreservação espermática de jumentos, porém, pesquisas relevantes vêm tentando elucidar tais questões. É sabido que o plasma seminal em quantidades corretas pode auxiliar nos parâmetros seminais de jumentos, porém é necessário a remoção desses líquidos para viabilizar o processo de criopreservação (PAPAS *et al.* 2019). Quantidades elevadas de plasma seminal são prejudiciais aos espermatozoides, podendo desencadear a formação de espécies reativas ao oxigênio (EROS; LEN *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de técnicas, práticas e protocolos de congelação de sêmen na espécie asinina se faz extremamente importante, visto que os estudos nessa espécie ainda são escassos e inconclusivos. Diante do exposto, o trabalho visa avaliar as técnicas de criopreservação na espécie asinina, com destaque para as práticas de remoção do plasma seminal, por centrifugação ou filtração e a escolha dos sistemas de congelação, convencional ou automatizado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo de criopreservação de sêmen para a espécie asinina (*Equus asinus*).

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito sobre os parâmetros cinéticos, integridade e funcionalidade de membrana, da técnica de centrifugação para remoção do plasma seminal de ejaculados de jumentos submetidos à criopreservação;
- b) Analisar o efeito sobre os parâmetros cinéticos, integridade e funcionalidade de membrana, da técnica de filtração para remoção do plasma seminal de ejaculados de jumentos submetidos à criopreservação;
- c) Mensurar os efeitos da congelação nos sistemas, automatizado e convencional, sobre os parâmetros de motilidade, integridade de membranas plasmática e mitocondrial, na pós-descongelação imediata, no momento zero e duas horas pós-descongelação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Comportamento Reprodutivo dos Equídeos

Os estudos comportamentais dos equídeos são baseados em observações no seu *habitat* natural, esses são realizados em populações de animais livres, tomando como base a observação dos mesmos no ambiente natural (MCDONNELL, 2011). Apesar das diversas semelhanças anatômicas e fisiológicas compartilhadas entre os equídeos, observamos diferenças comportamentais marcantes entre indivíduos dessa família.

A organização social dos equídeos apresenta diferenças dentro do gênero e até mesmo dentro dos subgêneros. A Zebra-das-planícies (*Equus burchelli*) convivem em grupos de membros fixos, as fêmeas possuem apenas um macho apresentando comportamento monogâmico em estrutura de harém. Quanto à zebra-de-grevy (*Equus grevyi*) as fêmeas desses subgênero apresentam comportamento poligâmico, ou seja, os machos desempenham um papel territorialista dentro dos rebanhos (GINSBERG; RUBENSTEIN, 1990).

A estrutura em harém é igualmente observada no cavalo-de-przewalski (*Equus przewalskii*), animais nativos da Mongólia. Na natureza os garanhões servem grupos de três a cinco éguas, fato não observado em animais de cativeiro onde os machos tendem a servir mais fêmeas (BOYD, 1991). O cavalo doméstico (*Equus caballus*), assim como seu parente o cavalo-de-przewalski, mantém semelhanças na sua organização sexual, na maioria das vezes o macho dominante, mantém o grupo coeso e unido, procurando direcionar os movimentos afastados de outros machos e fêmeas de outros haréns (MCDONNELL, 1986).

Nos equinos domésticos ainda observamos outros tipos de formação, o grupo dos machos solteiros, onde os indivíduos não possuem harém formado, esses permanecem perambulando sem fêmeas disponíveis. Um terceiro grupo, não tão comum, é composto por machos e fêmeas jovens em transição (MCDONNELL, 2011).

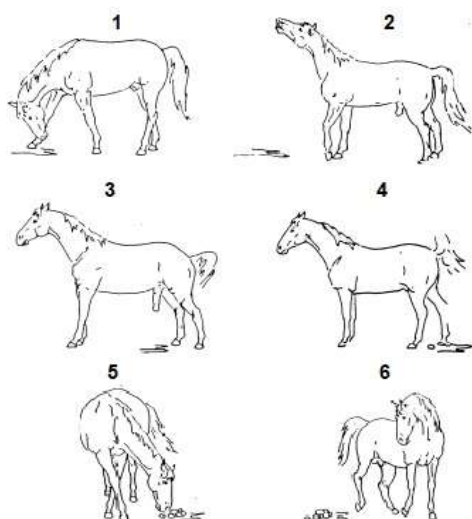
O asno-selvagem-africano (*Equus africanus*) e o hemíono (*Equus hemionus*) são animais de comportamento territorial, ambos têm hábitos idênticos a zebra-de-grevy (*Equus grevyi*) (KLINGEL, 1998). Segundo Henry *et al.* (1991), os jumentos (*Equus asinus*) apresentam organização sócio sexual territorial. Foi observado que os jumentos passam mais tempo em um determinado local e acasalam em dois locais contínuos. As fêmeas se movem em torno dessas áreas e não há interferência dos machos, como ocorre nos cavalos.

Outra formação observada nos asininos são os machos solteiros, esses podem formar grupos com territórios pré-estabelecidos, ou vagar pelas margens de localidades de machos dominantes. Em algumas situações, os machos solteiros mantêm uma relação estável com os machos dominantes, não causando ameaça a dominância destes, essa é uma forma dos machos subalternos terem acesso aquelas fêmeas que por ventura não foram cobertas pelo macho alfa do bando (MCDONNELL, 1998).

Nos equinos, a formação e manutenção dos haréns se dá por marcação com excreções urinárias e fecais. Essas respostas são realizadas por abordagem, procura e cobrição das fezes de animais de outros haréns. No processo de demarcação há procura e farejamento das fezes (Fig. 1). Outra característica marcante nos cavalos é deposição de fezes e urina sob fezes de animais de outros grupos (MCDONNELL, 1986).

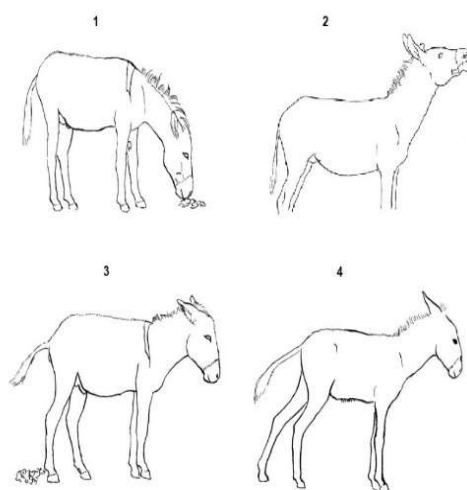
Comportamento semelhante é observado nos jumentos. Nesses animais é visto a defesa do território por procura e cobertura das fezes de machos não pertencente aqueles naquela área, os machos dominantes tentem a defecar e urinar sobre a fezes de seus adversários (Fig. 2), os machos atraem o grupo de fêmeas sexualmente ativas para o território através da vocalização (MCDONNELL, 1998).

Figura 1. Comportamento de eliminação das fezes/urina e marcação territorial na espécie equina



Adaptado (MCDONNELL, 1986).

Figura 2. Macho asinino realizando procura, reflexo *flehmen*, cobrindo com fezes e urinando sobre para demarcar território.



Adaptado (MOEHLMAN, 1998)

O território dos machos dominantes pode ser muito extenso, podendo ocupar uma área muito extensa, as fêmeas não mantêm predileção por uma determinada área, podendo essas transitarem livremente em busca de água e pastagem (HENRY; LAGO; MENDONÇA, 2009). Uma das formas de sinalizar o momento pré-copulatório é através da vocalização, que é realizado pelas jumentas. Nos asininos, esse processo é mais eminente que nos cavalos domésticos (HENRY *et al.*, 1991).

O conhecimento das fases de cortejo e cópula nos asininos é essencial para evitar erros de manejo nessa espécie. Equívocos são cometidos devido os asininos terem semelhanças físicas com os equinos, e muitas vezes o manejo reprodutivo adotado em equinos é padronizado para os asininos.

O comportamento pré-copulatório nos jumentos inclui: contato inicial via olfação, mordidas, cheiro na região da cabeça, pescoço, jarrete, flanco e região perineal, olfação em secreções urinárias e fecais das fêmeas em estro. O jumento realiza uma sequência de evento coordenados e interrompidos antes de realizar a cópula (MCDONNELL, 1998).

Segundo Moehlman (1998), o comportamento pré-copulatório em jumentos segue a seguinte ordem: (1) postura da fêmea em estro; (2) aproximação do macho pelos quartos traseiros da fêmea; (3) o macho cheira a região e ou deita a cabeça na garupa, e ou pressiona o peito contra a garupa da fêmea; (4) o macho realiza reflexo de *flehmen* depois cheira a genitália da fêmea e ou o macho cheira a urina da fêmea presente no chão, (5) o macho se dirige a fêmea, (6) o macho realiza salto na fêmea com o pênis não erétil, (7) por fim, o macho realiza a cópula com o pênis erétil.

Outro ponto inerente do cortejo dos asininos é o comportamento de distanciação ou afastamento. O macho realiza os saltos com o pênis retraído e logo em seguida afasta da fêmea pastando e mostra desinteresse pelo ato sexual. Mesmo mantendo uma certa distância, por volta de 20 a 30 metros da fêmea, o macho realiza exteriorizações parciais do pênis (HENRY; LAGO; MENDONÇA, 2009).

Segundo Henry *et al.* (1991), a cópula nos jumentos é semelhante aos cavalos, o tempo de copulação varia entre 25 a 30 segundos. Por fim, ao término da cópula, o macho se distancia da fêmea chegando a passar por volta de uma hora se mantendo afastado do restante do grupo sem expressar preocupação com a fêmea (HENRY; LAGO; MENDONÇA, 2009).

3.2 O Espermatozoide Asinino

Os espermatozoides são células formadas a partir de células-tronco, processo este iniciado nas paredes dos túbulos seminíferos e terminado na liberação desses nos próprios túbulos seminíferos. Esse processo é conhecido por espermatogênese (STABENFELDT; EDQVIST, 1996).

As células espermáticas têm apresentação morfológica clássica: uma célula alongada, cabeça chata (contendo um núcleo complexo) e cauda com a função de motilidade celular. O espermatozoide ainda é recoberto por plasmalema ou membrana plasmática. Outras estruturas presentes no espermatozoide são o acrosso, que consiste numa parede dupla localizada entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça, e por fim o colo, estrutura que conecta a cabeça com a cauda do espermatozoide (GARNER; HAFEZ, 2004).

O espermatozoide asinino, como na maioria dos mamíferos, é uma célula extremamente especializada. No jumento, o espermatozoide possui as seguintes dimensões: cabeça (6,9 μm de comprimento, 3,96 μm largura); peça intermediária (9,9 μm no comprimento) e peça principal (47,3 μm comprimento, 64,1 μm na largura) (CUMMINS; WOODALL, 1985).

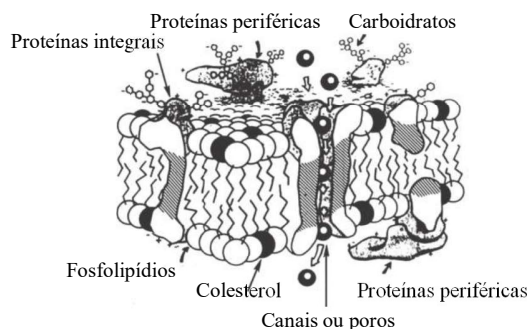
A membrana plasmática é a estrutura que recobre todo espermatozoide, sendo a parte mais externa da célula espermática, porém há diferenças na função de acordo com a região. Ainda é desconhecido as diferenças nas zonas da membrana plasmática, no entanto é sabido que nas porções rostral e caudal da cabeça, peça intermediária e peça principal apresentam funções distintas que culminam na sobrevivência do espermatozoide (AMANN; GRAHAM, 2011).

A composição química da membrana plasmática é uma bicamada fosfolipídica composto por colesterol, carboidratos complexos e proteínas. Uma das funções do colesterol é servir de componente estabilizador da membrana plasmática (LANGLAIS; ROBERTS, 1985). Algumas das proteínas são incorporadas nas camadas lipídicas em extensões variadas, mas outras estão localizadas no folheto lipídico externo e estão associadas ao glicocálice.

Foi observada a existência de proteínas transmembranares na bicamada lipídica como nos canais iônicos, poros e receptores. As proteínas representam cerca de 50% do peso da membrana plasmática, essas fazem ligação com as fontes de lipídeos, podendo ser consideradas integrais ou periféricas. Uma das funções das proteínas integrais é exercer o

papel de poros ou canais atrás da membrana plasmática, e as demais proteínas compõem a bicamada da membrana (MEYERS, 2009).

Figura 3. Diagrama representativo da membrana plasmática



Adaptado (AMANN; GRAHAM, 2011).

A cabeça do espermatozoide possui núcleo, acrossomo, lâmina pós-acrossômica e membrana plasmática. No núcleo é observado a presença de cromatina condensada e DNA com protaminas, quando visto no microscópio eletrônico é observado uma aparência homogênea nessas estruturas. O núcleo é delimitado por um envelope nuclear de dupla camada, que apresenta poucos poros (AMANN; GRAHAM, 2011).

Uma das principais estruturas presentes na cabeça do espermatozoide é o acrossoma, essa estrutura está localizada entre a membrana plasmática na região anterior da cabeça e no envelope nuclear, essa estrutura possui um conjunto de membranas interna e externa, sobrepondo a membrana plasmática e se fundindo durante a reação acrossomal (MEYERS, 2009). O acrossoma tem papel fundamental na ligação entre espermatozoides e óvulo; durante o processo de fertilização, esse vai atuar em conjunto com a membrana plasmática durante os primeiros eventos da fertilização (ABOU-HAILA; TULSIANI, 2000).

Esses eventos desencadeiam modificações na composição lipídica do espermatozoide, como hidrólise de sulfatos de esterol para esterol livre, efluxo de colesterol e formação de lisofosfatídeos pela fosfolipase endógena (GURAYA; SIDHU, 1989). O cálcio participa dos processos de capacitação e reação acrossomal. Esse micromineral é o principal mensageiro na troca de informações entre espermatozoides e óvulos (DARSZON *et al.*, 2006; WITTE; SCHÄFER-SOMI, 2007).

O espermatozoide de jumento apresenta diferenças morfológicas quando comparado a outras espécies; nos asininos fica evidente uma cabeça em formato esférica, quando

consideramos o espermatozoide de outros animais (NISHIKAWA; WAIDE; ONUMA, 1952; NISHIKAWA, 1959).

O colo é a parte onde há conexão entre a cabeça do espermatozoide e a peça intermediária, é uma região extremamente frágil, sendo uma estrutura de conexão que contém vários elementos especializados. Os defeitos provenientes de inserção de colo são decorrentes da espermatogênese, defeitos hereditários e até mesmo pela separação devido ao mal funcionamento no epidídimo e ou traumas físicos (AMANN; GRAHAM, 2011). Uma patologia morfológica conhecida como inserção abaxial é considerada dentro da normalidade na espécie asinina, outra característica marcante é o acrossomo não tão evidente como nas demais espécies (BIELAŃSKI; KACZMARSKI, 1979).

A região da cauda ou flagelo é composto por peça intermediária, principal e terminal. (HAFEZ, 2005). Essa estrutura é responsável por fornecer motilidade, e é essencial para a movimentação do espermatozoide dentro do trato genital feminino até chegar no local de fertilização, na ampola do oviduto da fêmea (MEYERS, 2009). A cauda compreende o colo até o *annulus*, sendo denominada de peça intermediária. Essa estrutura é um complexo de microtúbulos com disposição radial que circunda os filamentos centrais do flagelo, conjuntamente com o comprimento total da cauda, formando o axonema (GARNER; HAFEZ, 2004). O complexo axonema consiste em um par central de dois microtúbulos únicos, que são cercados por feixes cilíndricos duplos uniformemente distribuídos. Por fim, encontramos a peça terminal, que contém nove pares e são transformados em 18 microtúbulos únicos (PESCH; BERGMANN, 2006). O espermatozoide asinino apresenta uma cauda mais longa, com 57,2 μm , comparado com espermatozoide de garanhão, com 53,6 μm (NISHIKAWA; WAIDE; ONUMA, 1952; NISHIKAWA, 1959; CUMMINS; WOODALL, 1985).

3.3 Importância do Plasma Seminal nos Asininos

O plasma seminal dos mamíferos é uma secreção fisiológica proveniente dos órgãos sexuais masculinos: epidídimos, e principalmente das glândulas acessórias (próstata, bulbo uretrais e vesiculares; GARNER; HAFEZ, 2004; TROEDSSON *et al.*, 2005). Uma importante função atribuída ao plasma seminal é a de maturação final dos espermatozoides. Esse processo é desencadeado por ação de hormônios, enzimas e modificações na superfície

das células espermáticas, desta forma, funcionando como um ativador dos movimentos espermáticos (MANN, 1978).

Os espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo e dos ductos deferentes são imóveis, o plasma seminal confere à motilidade nessas células. Em equinos, algumas evidências demonstram que o plasma seminal é responsável pela redução nos parâmetros espermáticos e baixa fertilidade, principalmente, quando o sêmen passa pelo processo de armazenamento (AMANN; GRAHAM, 2011). No ejaculado, o plasma seminal contribui com a maior parte do volume, dependendo de razões individuais do macho ou da época do ano, o fluido secretado pelas glândulas vesiculares pode ou não contribuir com a maior parte do volume no ejaculado (MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

Os constituintes bioquímicos do plasma seminal, em altos níveis, são o ácido cítrico, ergotioneína, frutose, glicerilfosforilcolina e sorbitol. Em quantidades consideráveis encontramos ácido ascórbico, aminoácidos, peptídeos, proteínas, lipídeos, ácidos graxos e algumas enzimas. Agentes imunológicos como imunoglobulinas da classe IgA e hormônios como estrógenos, prostaglandinas, andrógenos, FSH, LH, gonadotrofina coriônica, hormônio do crescimento e outros podem ser encontrados no plasma seminal (GARNER; HAFEZ, 2004). Os componentes orgânicos do plasma seminal são essenciais para manter o metabolismo espermático, potencial hidrogeniônico (pH), osmolaridade e as proteínas, sendo estas últimas as mais importantes para função espermática em mamíferos (MAXWELL *et al.*, 2007).

A composição do plasma seminal pode influenciar a estabilidade da membrana plasmática, sendo um agente indispensável para qualidade seminal (AURICH *et al.*, 1996). Porém, outros estudos demonstraram que o plasma seminal afeta a motilidade e viabilidade sêmen de touros (BAAS; MOLAN; SHANNON, 1983) e afetou negativamente o espermatozoide de garanhões (VARNER *et al.*, 1987; JASKO *et al.*, 1991). No âmbito geral existem controvérsias quanto à atividade do plasma seminal e a sua interferência na função espermática permanece em condição de especulação, já que foram encontrados efeitos inibitórios e estimulantes (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008).

Os espermatozoides são células que apresentam limitações na sua capacidade de movimentação, existindo uma correlação direta entre os níveis seminais e a motilidade espermática (AMANN; HAMMERSTEDT; VEERAMACHANENI, 1993; ELZANATY *et*

al., 2002), portanto sua funcionalidade é controlada por fatores externos, que atuam através dos componentes da superfície celular e na membrana plasmática. As células espermáticas isoladas são incapazes de se ligar a zona pelúcida e fertilizar o óvulo (MUIÑO-BLANCO; PÉREZ-PÉ; CEBRIÁN-PÉREZ, 2008). Para que o espermatozoide tenha motilidade progressiva e capacidade de fertilização é necessário que ocorra uma extensa remodelação da membrana plasmática, durante o trânsito epididimário e no trato reprodutivo feminino, por processos geralmente referidos como maturação e capacitação epididimária (YANAGIMACHI, 1994).

Essas modificações e absorções de novos elementos dos fluidos genitais são essenciais para maturação espermática. As proteínas dos fluidos epididimário e seminal são absorvidas nos espermatozoides à medida que entram em contato com os órgãos do trato masculino e feminino; em seguida há uma reorganização em regiões específicas da superfície espermática (DACHEUX *et al.*, 2005; MARENGO, 2008). Outros componentes presentes no plasma seminal que desempenham um papel importante na fertilização são os polipeptídeos (SOUZA *et al.*, 2008).

A presença de proteínas no plasma seminal tem participação específica na região acrossomal em várias espécies (CABALLERO *et al.*, 2004; KAMARUDDIN *et al.*, 2004). Provavelmente elas são removidas, modificadas e marcadas antes que os espermatozoides sofram reação acrossomal (YANAGIMACHI, 1994; FRASER *et al.*, 1996), e são essenciais para o processo de fertilização (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; ROBERTS *et al.*, 2003).

Os processos de refrigeração, congelamento e descongelamento são responsáveis por alterações e injúrias na função espermática (WATSON, 1981). A membrana plasmática e o acrossoma são zonas críticas para a sobrevivência dos espermatozoides, tanto no processo de congelamento quanto no processo de descongelamento, essas regiões são o principal local de alterações e injúrias causadas por esse processo. Essas mudanças ocorrem devido às tensões térmicas, mecânicas, químicas e osmóticas (WATSON, 1995; MAXWELL; WATSON, 1996; PRATHALINGAM *et al.*, 2006).

As evidências de inúmeros estudos indicam que a remoção ou modificação dos componentes do plasma seminal, em particular as proteínas, durante o processo de manipulação do sêmen, seja pela centrifugação ou sexagem do sêmen, afetam as

propriedades na superfície espermática, resultando em desestabilização da membrana, redução do tempo de vida e diminuição do número de células viáveis (LEAHY; GADELLA, 2011; LEAHY; DE GRAAF, 2012). Esses efeitos podem ocorrer, antes ou após o processamento do sêmen (MAXWELL *et al.*, 2007; MAXWELL; WELCH; JOHNSON, 1997).

Normalmente, em equídeos, o plasma seminal é removido durante o processamento de criopreservação. Quantidades em torno de 0 a 5% do volume original do plasma seminal são aceitáveis durante o processamento. A remoção do plasma seminal foi relatada como necessária para manter os espermatozoides vivos quando submetidos a criopreservação em mamíferos (AMANN; PICKETT, 1987).

Há relatos que uma certa quantidade de plasma seminal, em cada dose de sêmen, pode ser considerada benéfica para manter a fertilidade nas amostras de sêmen (HÖFNER; LUTHER; WABERSKI, 2020). Porém, a exposição prolongada ao plasma seminal durante o armazenamento cria uma situação não fisiológica. Na monta natural é observado uma separação logo após a cobertura, nessa situação é observada uma divisão entre as células espermáticas e o plasma seminal pelo trato reprodutor feminino (HUNTER, 1981).

Na inseminação artificial há a necessidade da remoção de uma certa quantidade de plasma seminal, para reduzir as injúrias causadas por este. O sêmen equino apresentou resultados insatisfatórios quando exposto a altos níveis de plasma seminal (em torno de 20% em volume total) por períodos de tempo variando entre 20 a 90 minutos antes da congelação. O plasma seminal causa prejuízo às células espermáticas quando esses são submetidos à congelação, essas informações são fundamentais para o entendimento da ação do plasma seminal frente as células espermáticas no processo de congelação (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005).

Baseado nos benefícios causados pelo plasma seminal, vários estudos têm sido realizados com o intuito de melhorar as taxas de gestações na espécie asinina, visto que os resultados de inseminação artificial com sêmen congelado nessa espécie ainda são relativamente baixos. Em inseminação artificial com sêmen fresco foram observadas taxas de 51 a 73% (OLIVEIRA *et al.*, 2012), com sêmen refrigerado 45% (ALVAREZ *et al.*, 2004); (VIDAMENT *et al.*, 2009; PEÑA-ALFARO *et al.*, 2012) e com sêmen congelado 0

a 36% (TRIMECHE; RENARD; TAINURIER, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006; ROTA *et al.*, 2012).

Em equinos foram evidenciados os benefícios da adição do plasma seminal, com sêmen congelado, na pós-descongelção, e foram observados resultados positivos sobre os espermatozoides (CALVETE; SANZ, 2007), podendo melhorar a viabilidade espermática, integridade de membrana acrossomal (DE ANDRADE *et al.*, 2011), e promove ação antioxidante nas células espermáticas (WNUK *et al.*, 2010).

O sêmen descongelado de jumento, com ou sem plasma seminal, induziu uma resposta inflamatória, desencadeando uma ação de polimorfonucleares no endométrio de jumentas. O sêmen congelado apresentou uma intensa ação dos genes COX-2, após 6 horas da inseminação artificial e foi observado que a adição de plasma seminal reduziu a ação dos genes COX-2 (VILÉS *et al.*, 2013).

A adição de plasma seminal, em amostras de sêmen congelado, apresentou resultados de fertilidade bastante satisfatórios, sendo 61,5%, no grupo com 70% de plasma seminal, e 23,1% no grupo sem plasma seminal. Nesse mesmo estudo além do aumento considerável na fertilidade, foi observado maior recuperação de polimorfonucleares nos lavados uterinos, sendo constatado que houve uma limpeza mais efetiva do trato genital feminino (ROTA *et al.*, 2012).

É possível que a adição de plasma seminal cause um efeito protetor a célula espermática. No entanto, há fortes indícios que exista uma relação direta envolvendo a ação do plasma seminal sobre o ambiente uterino, é possível que o plasma seminal expresse suas atividades em nível de trato reprodutor feminino e não apenas na célula espermática (SABATINI *et al.*, 2014).

3.4 Princípios da Criopreservação

Com o desenvolvimento de pesquisas, é possível a criopreservação de sêmen em diversas classes animais como mamíferos, pássaros, peixes e outras espécies (GRAHAM; SCHMEHL; DEYO, 1984). No entanto, existem diferenças na criopreservação do sêmen, tanto entre espécies e indivíduos, podendo haver maior aceitação ou resistência a essa técnica (GRAHAM, 2011).

Para a sobrevivência da célula espermática, submetida ao processo de criopreservação, é necessário respeitar uma série de fatores intrínsecos da célula como: membrana plasmática, acrossoma, mitocôndrias, citoesqueleto, núcleo e glicocálice. Ainda há a necessidade de controlar fatores externos como a velocidade de refrigeração, manutenção das temperaturas durante o procedimento e curvas de refrigeração (GRAHAM, 1996).

Muito dos solutos e solventes presentes nos diluentes podem permear a membrana plasmática das células, assim como há solutos que não apresentam a capacidade de penetração na membrana plasmática. Os solutos adicionados nas amostras de sêmen manterão um equilíbrio no meio, este é o caso da maioria dos crioprotetores penetrantes (GRAHM, 2011).

Um exemplo desse equilíbrio é a ação do glicerol frente a célula espermática, essa substância permeia a membrana plasmática, sendo mais lenta a sua penetração na célula espermática que a água. Portanto, quando o glicerol é adicionado a uma amostra de sêmen, a água sai da célula espermática em uma taxa muito mais rápida do que a penetração do glicerol nessa célula (AMANN, 1999; MERYMAN, 2007).

A exposição hiperosmótica excessiva pode causar alterações na permeabilidade, integridade e função da membrana plasmática, podendo resultar no extravasamento da célula, sem prejudicar a integridade da membrana. A forma mais comum de dano hiperosmótico é resultante da difusão de solutos não penetrantes através da membrana da célula (HAMMERSTEDT; GRAHAM; CAROLINA, 1992; MERYMAN, 2007).

A capacidade de uma célula suportar a ruptura, e não extravasar, durante o processo de criopreservação depende de sua permeabilidade de membrana e relação entre crioprotetor e água. Os crioprotetores com maior poder de permeabilidade se difundem mais rapidamente e as células sofrem menos danos, apresentando um menor grau de inchaço na célula, sendo denominado tolerância osmótica da célula. Algumas células suportam maiores estresses osmóticos (MERYMAN, 2007; HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; WATSON *et al.*, 1992).

A adição de solutos, sais ou açúcares à água diminui a temperatura e reduz o ponto de congelamento do diluidor, ou seja, a água pura congela no ponto de congelamento de 0°C , enquanto a solução salina fisiológica, com 300 mOsm, congela a -0.6°C . Quando são

adicionadas concentrações mais altas de solutos, o ponto de congelação é ainda mais baixo (AMANN; GRAHAM, 2011).

Se o soluto adicionado for um líquido, como o etilenoglicol, o glicerol ou a metil formamida, o ponto de congelação é reduzido, da mesma forma quando é usado sais ou açúcares. Esses compostos permanecem descongelados mesmo em baixas temperaturas. Além disso, esses compostos penetram na membrana plasmática, ou seja, os efeitos osmóticos que eles exercem na célula são apenas transitórios e ocorrem apenas no momento em que são adicionais ou removidos. Portanto, essas substâncias aumentam o volume total dos canais e diminuem as concentrações de sais observadas nas células, diminuindo os efeitos deletérios de ambos (GRAHAM, 2011).

Uma situação adversa encontrada na congelação é a formação de cristais de gelo. Uma vez formada, a taxa de crescimento desses cristais depende muito em função da velocidade de redução da temperatura. Quanto mais baixa a redução da temperatura, mais lenta será a taxa de formação de cristais de gelo. Quando é realizado uma refrigeração rápida, resultará em menor formação de cristais de gelo (MERYMAN, 2007).

A cristalização pode ser evitada através da baixa do ponto de congelação sendo realizada através da adição de solutos em altas concentrações. As soluções líquidas se tornam cada vez mais viscosas com a redução da temperatura assim, baixa-se a temperatura e aumenta-se a concentração, levando a um estado sólido, também conhecido como vitrificação (MERYMAN, 2007). Esse processo consiste em uma remoção ultrarrápida, evitando a formação de cristais de gelo após a exposição ao nitrogênio, resultando em uma formação semelhante ao vidro, essa condição ocorre dentro da célula espermática (MCCUE; SQUIRES, 2015).

3.5 Congelação de Sêmen de Equídeos

Nas últimas décadas, os avanços na técnica de congelação em sêmen de equídeos foram notáveis, muito embora que essa prática nesses animais ainda fique a desejar, principalmente quando comparada a outras espécies domésticas. Um longo caminho ainda deve ser percorrido para alcançar ótimas taxas de gestações, porém a aceitação da técnica por proprietários e veterinários tem sido cada vez maior ao redor do mundo (SANCHEZ; GOMES; SAMPER, 2009).

Os principais protocolos para congelamento de sêmen de equídeos envolvem uma série de procedimentos e cuidados, que devem ser tomados, desde da individualidade do macho até as taxas de diluição e curvas de refrigeração. A princípio, a diluição deve ser realizada em duas etapas, onde é adicionado um diluidor primário, geralmente um diluidor de refrigeração, com o objetivo de ser realizada a centrifugação e posteriormente a adição de um segundo diluidor de congelamento, esse tem por objetivo proteger as células espermáticas dos efeitos criogênicos. Ainda não existe um diluidor padronizado que apresente resultados satisfatórios, como o utilizado na espécie bovina (SIEME, 2011a).

3.6 Crioprotetores usados na congelamento de sêmen de asininos

Após o processo de colheita do sêmen, remoção da porção gel e avaliações laboratoriais, as amostras recebem um diluidor de refrigeração. Esses diluentes são a base de leite desnatado e açúcares, outros diluentes usados na pré-congelamento são a base de sacarose a 11% (PIAO; WANG; CHENG, 1988), solução com ringer lactato adicionado de leite em pó desnatado e glicose, (MIRÓ *et al.*, 2005) e solução glicose-EDTA (MARTIN; KLUG; GÜNZEL, 1979). A função dessa primeira diluição é manter as células espermáticas com motilidade e proteger contra a ação deletéria da centrifugação.

A composição e concentração espermática presente no sêmen podem causar uma série de efeitos adversos aos espermatozoides, portanto é necessário a realização desses procedimentos antes que o sêmen atinja a temperatura de 5 °C. A taxa de diluição nesses casos devem ser de 1:1 (sêmen:diluidor), obedecendo a concentração de ± 50 milhões de espermatozoides por mL (SIEME, 2011a). Esses procedimentos de diluição são adequados e fundamentais para a manutenção da integridade e viabilidade das amostras (SQUIRES *et al.*, 1999; ARRUDA, 2000; PAPA; MELO; DELL'AQUA JÚNIOR, 2005).

Os diluentes de congelamento são compostos basicamente por uma fonte de energia (açúcares), uma fonte de lipoproteínas (gema de ovo, leite ou ambos combinados), antibióticos, com o intuito de inibir o crescimento bacteriano e evitar possíveis infecções uterinas, e tampões para equilibrar o pH e a pressão osmótica (SIEME, 2011a). A função primordial desses compostos é a de fornecer proteção às células espermáticas, visto que essas serão submetidas a um estresse térmico muito grande, outra função, tão importante, é o

prolongamento da viabilidade dessas células e por fim o aumento do volume da dose inseminante (DARENIUS, 1998).

Um diluidor para ser considerado propício deve possuir e ofertar algumas propriedades como: eficácia na neutralização de catabólitos (provenientes das células espermáticas), pressão osmótica (devendo ser levado em consideração a forma de processamento do sêmen), equilíbrio dos minerais, nutrientes necessários para fornecer energia para célula espermática, preservar as células contra variações de temperaturas, principalmente o frio intenso, estabilização da membrana, não conter agentes patogênicos, baixo custo, baixa toxicidade aos espermatozoides e ao trato reprodutivo feminino (AMANN; CRISTANELLI; SQUIRES, 1986).

A espécie asinina não apresenta taxas de fertilidades tão consolidadas, com o uso de sêmen congelado, como é observado nos equinos. Várias pesquisas ao longo dos anos vêm tentando aprimorar as técnicas de processamento e os diluentes usados nessa espécie.

Os primeiros estudos realizados com sêmen congelado de asinino usaram diluentes à base de glicose, gema de ovo, glicerol, lactose e rafinose. Ao avaliar a fertilidade das amostras, a taxa de gestação ficou em torno de 50%, entretanto, uma desvantagem desse estudo foi o pequeno um número de fêmeas inseminadas, sendo apenas duas (KRAUSE; GROVE, 1967). Em trabalhos usando diluidor à base de lactose acrescido de gema de ovo e EDTA, e dose semelhante à usada em cavalos, em torno de 300 a 400 x 10⁶ espermatozoides/mL, a inseminação realizada intracornual profunda obteve taxa de prenhez de 66,7%, entretanto, o número de animais inseminados continuou baixo, composto de nove fêmeas (VIEIRA; ARRUDA; MANZANO, 1985).

Arruda *et al.* (1986), utilizando diluidor a base de lactose_EDTA e gema de ovo, encontraram taxa de gestação de 44% (7/16), com variação na concentração espermática da dose inseminante, que variou entre 250 a 600 x 10⁶ espermatozoides por palheta. Trimeche; Renard e Tainturier (1998) observaram a remoção do glicerol nas amostras de sêmen de jumentos e sugeriram que o espermatozoide asinino seria sensível ao glicerol, uma vez que no momento da inseminação artificial, o glicerol foi removido das amostras de sêmen no pós-descongelamento. As taxas de gestação obtidas neste procedimento foram as seguintes: 62% (8/13) de prenhez no grupo que o glicerol foi removido e 0% (0/17) de prenhez no grupo com glicerol.

Rozas (2005) testou diluentes à base de glicose + EDTA + 2,5% de dimetilformamida (DMF) e obteve taxa de 0% (0/8) de prenhez, já com o diluidor à base de glicose + EDTA + 2,5% glicerol + complexo colesterol ciclodextrina (CLC), as taxas de gestação foram 0% (0/7) e na combinação de glicose + EDTA + 2,5% de dimetilformamida (DMF) + colesterol (CLC), observou-se taxa de 11% (1/9) de prenhez. Um fato interessante nesse estudo é que as inseminações foram realizadas 12 h antes da ovulação, levando ao entendimento que o sêmen não apresentou resistência ao longo período de tempo no trato das fêmeas.

Japsen *et al.* (2010) testaram três tipos de diluentes (EZ Mixin; 20% gema de ovo e 2% Etilenoglicol), (EZ Mixin; 5% gema de ovo e 2% Etilenoglicol) e (EZ Mixin; 20% gema de ovo e 2% Etilenoglicol + 60mM β -ciclodextrina). Estes autores observaram as seguintes taxas de gestação 6,3% (1/15), 46,5% (20/43) e 58,3 (14/24), respectivamente, e atribuíram efeito benéfico do colesterol no processo de criopreservação de sêmen de jumento.

Na sequência, foram testados os diluentes comerciais INRA 96-EYG (IMV Technologies, L'Aigle, France; contendo 2% de gema de ovo e 2,5% glicerol) e Gen B (Minitub Tiefenbach, Germany; contendo 1,5% dimetilsulfóxido (DMSO) e 1% de etilenoglicol). Nesse trabalho não foi realizado teste de fertilidade, no entanto foi observado que o diluente Gen B melhorou a qualidade espermática de jumentos (ACHA *et al.*, 2016).

Ferrante *et al.* (2018) testaram a ação dos diluentes a base de leite desnatado, com 7% de dimetilsulfóxido (DMSO), 11% de lactose, 0,5% Equex e 20% de gema de ovo centrifugada. Esse estudo demonstrou que é possível congelar sêmen de jumento com 7% de dimetilsulfóxido (DMSO) e que a gema de ovo a 3,2% mostrou resultados benéficos nas amostras centrifugadas.

A adição de três fontes de açúcares (glicose, frutose e sorbitol) ao diluente de congelamento (INRA 82 modificado) afetou a qualidade seminal no pós-descongelamento. Porém, o sorbitol se apresentou como uma alternativa viável para melhorar a qualidade seminal de jumentos (DORADO *et al.*, 2019).

3.7 Curvas de refrigeração e congelamento

Um dos pontos críticos na criopreservação de sêmen em equídeos é o processo de congelamento, devido a uma série de fatores nocivos para a célula espermática. Mudanças radicais de temperatura, estresse osmótico, exposição à agentes tóxicos e formação de cristais

de gelo intracelular são as causas mais frequentes para esta criticidade (WATSON, 2000; MARSHBURN *et al.*, 1992; BLACH *et al.*, 1989). Essas condições afetam diretamente a funcionalidade e a viabilidade das células espermáticas, levando à diminuição da longevidade e viabilidade no trato reprodutor feminino (ROTA *et al.*, 2012). Além do mais, o sêmen congelado desencadeia uma reação inflamatória mais acentuada no útero do que o sêmen fresco (KOTILAINEN; HUHTINEN; KATILA, 1994).

Para o sucesso na técnica de congelação é de extrema importância a refrigeração lenta e gradual das amostras de sêmen, normalmente, essas amostras reduzirão da temperatura ambiente até 5 °C, (redução de 0,1 °C por minuto; SIEME, 2007; VIDAMENT *et al.*, 2000). O espermatozoide pode suportar uma taxa de refrigeração rápida, partindo de temperaturas de 37 °C a 20 °C, mas é interessante manter uma redução progressiva da temperatura, podendo ser essa mais lenta entre 20 °C a 5 °C (<0.1 por minuto), a fim de manter a viabilidade do sêmen e diminuir os choques térmicos que podem ocorrer (SIEME, 2011b). A faixa de temperatura entre -15 e -60 °C é a mais prejudicial, podendo ocorrer danos irreversíveis as células espermáticas.

Novos protocolos de refrigeração usando diluidores comerciais (Botu-Crio™) que contém uma mistura de dois crioprotetores penetrantes (1% de glicerol e 4% de metilformamida) têm sido usados com sucesso na rotina de congelação de sêmen de garanhão. Com a utilização desse diluente pode ser realizada a curva de refrigeração mais rápida, usando uma taxa de refrigeração por 20 minutos até os 5 °C, em refrigerador doméstico. As amostras são levadas a vapor de nitrogênio líquido (3 a 6 cm de nível de nitrogênio), por 15 a 20 minutos, atingindo a temperatura final de -60 a -80 °C o processo é finalizado quando atingir a temperatura de -120°C e armazenadas em botijão criogênico (SIEME, 2011a; PAPA *et al.*, 2008).

Outro sistema efetivo e pragmático usado na congelação de sêmen de equídeos é o método automatizado (TK Tecnologia em Congelação, Brasil). Nesse sistema é usada uma curva de refrigeração de -1,5 °C por minutos até os 5 °C e -1,0 °C por minuto até os -40 °C, finalizando o processo com a taxa de -1,0 °C até atingir os -140 °C (DIAS MAZIERO *et al.*, 2013).

Em jumentos foram realizados estudos observando taxas de refrigeração de 0,3 °C, 0,5 °C e 0,6 °C por minuto, nesses trabalhos não foram observadas diferenças nos parâmetros

seminais, concluindo que essas taxas de refrigeração podem ser usadas em sêmen de jumento (OLIVEIRA *et al.*, 2016). Dias Maziero *et al.* (2013) observaram três taxas de redução de temperatura (0,3, 0,6 e 1,0 °C por minuto) e obtiveram resultados de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático superiores nos grupos de 0,6 e 1,0 °C por minuto, sendo um achado interessante nessa espécie. Em trabalhos recentes realizados por Ferrante *et al.* (2018) e Rota *et al.* (2012), foi observado que a curva rápida (4 °C por minuto) é a mais indicada para a espécie asinina.

3.8 Técnicas de Avaliação de Sêmen

O objetivo geral da avaliação do sêmen é prever a fertilidade individual do macho (PETRUNKINA *et al.*, 2007; COLENBRANDER *et al.*, 1992). Porém, a fertilidade nos equídeos apresenta variações individuais, nenhum teste laboratorial isolado é capaz de determinar a fertilidade das amostras de sêmen (ARRUDA *et al.*, 2007). A avaliação do sêmen tem por finalidade esclarecer se os parâmetros espermáticos quantitativos e qualitativos estão de acordo com os requisitos mínimos estabelecidos para cada espécie. Os valores mínimos são médias subjetivas, baseadas em padrões de valores espermáticos, em uma população de machos férteis (SIEME, 2009).

No Brasil preconiza-se a utilização do Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Nesse manual não consta a avaliação de sêmen de jumentos, ou seja, muito dos valores avaliados na espécie asinina são adaptações dos parâmetros seminais de equinos.

Em jumentos são encontrados valores de 40 a 100 mL, quando livre de gel (NISHIKAWA, 1959; HENRY *et al.*, 1987), cor branca acinzentada, odor *sui generis*, motilidade espermática de $\geq 60\%$, variações entre 70 a 100% (NISHIKAWA, 1959; HENRY *et al.*, 1987), vigor ≥ 3 , concentração espermática variável entre 100-800 x 10⁶/mL (KREUCHAUF, 1984), número total de espermatozoides 5 x 10⁹ e $\geq 70\%$ espermatozoides normais. Henry *et al.* (1987) observaram na morfologia valores espermatozoides com 9,1 e 6,3% de células anormais.

Para amostras de sêmen congelado são preconizados os valores mínimos: motilidade espermática $\geq 30\%$, vigor de ≥ 3 , dose de 100-200 x 10⁶ espermatozoides viáveis por palheta,

dose inseminante de 400×10^6 espermatozoides móveis e até $\geq 60\%$ de espermatozoides normais (CBRA, 2013).

Dentre as avaliações de extrema importância para determinar a viabilidade espermática podemos citar a concentração. A concentração espermática, ou densidade, representa o número total de espermatozoides por unidade de volume. É representado geralmente por milímetro (mm^3) ou centímetro cúbico ($\text{cm}^3 = \text{mL}$). A contagem é determinada por meio de contagem de células (método hematocítômetro) por câmera de Neubauer (CBRA, 2013; TOMLINSON *et al.*, 2001). As concentrações espermáticas podem sofrer influências de fatores como estações do ano, idade do animal e frequência de coberturas e até a forma de colheitas, por manequim ou fêmeas em cio (LUCENA *et al.*, 2014; SILVA FILHO *et al.*, 1999).

A motilidade dos espermatozoides é um importante parâmetro da funcionalidade da célula espermática, além de ser um método de avaliação simples, que pode ser realizada a campo com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro, sendo considerada uma das análises mais importante da qualidade do sêmen (SIEME, 2009). O objetivo dessa avaliação é estimar a quantidade de células em movimento e tradicionalmente a avaliação depende de estimativas subjetivas, sendo expresso o valor em porcentagem (CBRA, 2013).

A avaliação clássica por microscópio óptico de campo claro apresenta uma desvantagem, uma vez que o fato das estimativas de motilidade espermática podem variar de acordo com os examinadores (AMANN; KATZ, 2004). Para uma análise mais confiável, imparcial e consistente da motilidade espermática (como para fins de pesquisas científicas), é recomendável o uso do sistema automatizado (COLENBRANDER; STOUT, 2011).

O sistema *Computer Assisted Semen Analysis* (CASA) ou “Análise de Sêmen Assistida por Computador – livre tradução” permite a determinação objetiva de vários parâmetros espermáticos, desde a movimentação e suas variações, concentração, e morfologia (VARNER; VAUGHAN; JOHNSON, 1991).

Além da geração de imagens, porcentagens de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), o CASA pode calcular as variações dos parâmetros mais complexos, descrevendo com exatidão, quais os espermatozoides estão móveis, incluindo medições de velocidade como: velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de percurso (VAP),

Figura 4. Análise computadorizada de espermatozoides (CASA)
Pontos vermelhos movimentos rápidos, pontos verdes movimentos lentos e pontos amarelos células espermáticas sem movimentos

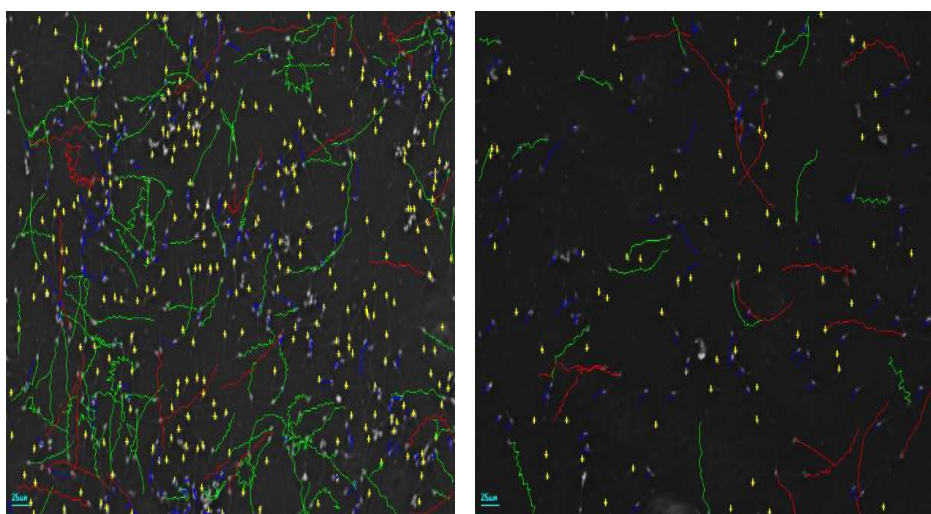
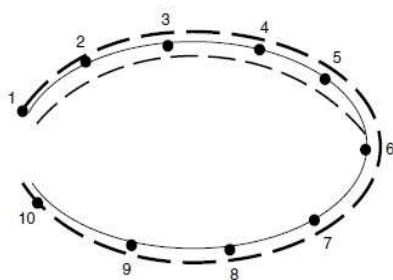


Foto: arquivo pessoal.

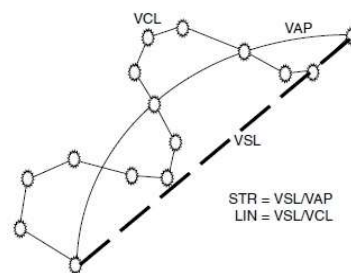
Figura 5. Influência do número de quadros analisados na linearidade dos espermatozoides por ciclo



Se o caminho for percorrido até o quadro seis a célula espermática é considerada linear. Se o caminho percorrer até o décimo quadro o movimento é considerado circular. Para o percurso do espermatozoide ser considerado reto depende do número de quadros percorridos.

Adaptado (SAMPER, 2009).

Figura 6. Representação gráfica dos diferentes parâmetros cinéticos avaliados pela análise computadorizada de espermatozoides (CASA)



Velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$) trajetória real do espermatozoide; velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$) velocidade média em função da linha reta; velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$) é a velocidade da trajetória média do espermatozoide; retilinearidade (STR-%) é a relação percentual entre VSL e VAP; linearidade (LIN-%) é a relação entre VSL e VCL.

Adaptado (SAMPER, 2009).

velocidade linear progressiva (VSL), e qualidade dos movimentos como linearidade (LIN), e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH).

A determinação dos parâmetros morfológicos do sêmen é de extrema importância para estabelecer se o reprodutor é apto ao ingresso em programas reprodutivos e períodos de estação de monta. A porcentagem geral de espermatozoides morfolologicamente normais pode ser considerada um aspecto de relevância para a qualidade espermática, já que existe uma correlação direta com a fertilidade nos machos (COLENBRANDER; STOUT, 2011). No entanto, uma baixa porcentagem de células normais (<30%) é um indicativo de subfertilidade nos equídeos (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2013).

Para a realização do exame de morfologia espermática é necessário o uso de um microscópio óptico, ou contraste de fase, ou ainda de interferência diferencial. Nesses casos é indicado que os esfregaços sejam corados pela técnica convencional, ou pela técnica de preparação úmida, que consiste na colocação de uma amostra de sêmen (alíquota), por sobre a lâmina, posteriormente sendo coberta por uma lamínula (CBRA, 2013).

Existem diversas técnicas de coloração espermática para determinar a morfologia do sêmen, dentre essas técnicas podemos citar Wiliams, Karras, eosina-nigrosina, vermelho congo, rosa de bengala (CBRA, 2013; SIEME, 2009). Para a realização do exame é necessário a leitura no aumento de 1000x com o uso de óleo de imersão. É necessário um avaliador experiente, e o exame deve ser realizado com paciência para que não ocorra erros. Devem ser contados no mínimo 100 células por lâmina (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2013).

Os espermatozoides que apresentam patologias podem ser classificados de duas formas, defeitos maiores e menores. Essa classificação é baseada em relação ao local anatômico do defeito, podendo ser na cabeça, peça intermediária e patologias de cauda e em alguns casos as células podem apresentar mais de um defeito na mesma célula. Ainda podemos classificar as patologias na região acrossomal e patologias relacionados com alterações na forma teratológicas (PAPA *et al.*, 2014; JASKO; LEIN; FOOTE, 1990). Outra forma de classificação dos defeitos pode ser por falhas primárias (oriundas da espermatogênese), secundárias (oriundas da maturação) e terciárias (danos ocorridos durante a ejaculação, transporte ou manuseio do sêmen) (BIELANSKI, 1951).

Uma das avaliações de extrema importância para determinar a viabilidade de células espermáticas é através das provas de integridade de membrana plasmática. O processo de criopreservação pode causar lesões irreparáveis nas membranas plasmáticas dos espermatozoides. Assim, para analisar a integridade dessas regiões, é usado diferentes técnicas de coração como a eosina-nigrosina (BARTH; OKO, 1989); (DOTT; FOSTER, 1972), sondas fluorescentes (HARRISON; VICKERS, 1990) e teste hiposmótico (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

Uma técnica bastante simples de determinação da integridade de membrana é pelo método de coloração supravital eosina-nigrosina, técnica que pode ser realizada a campo, fazendo o uso de um microscópio óptico de fundo claro (PAPA *et al.*, 2014). A técnica consiste na penetração do corante, que contém componentes permeabilizantes (eosina),

Figura 7. Teste de integridade de membrana plasmática por Eosina-nigrosina



Aumento de 40 e 400 x microscópio óptico.
Espermatozoide vermelho: membrana citoplasmática lesada.
Espermatozoide branco célula íntegra. Fonte: arquivo pessoal

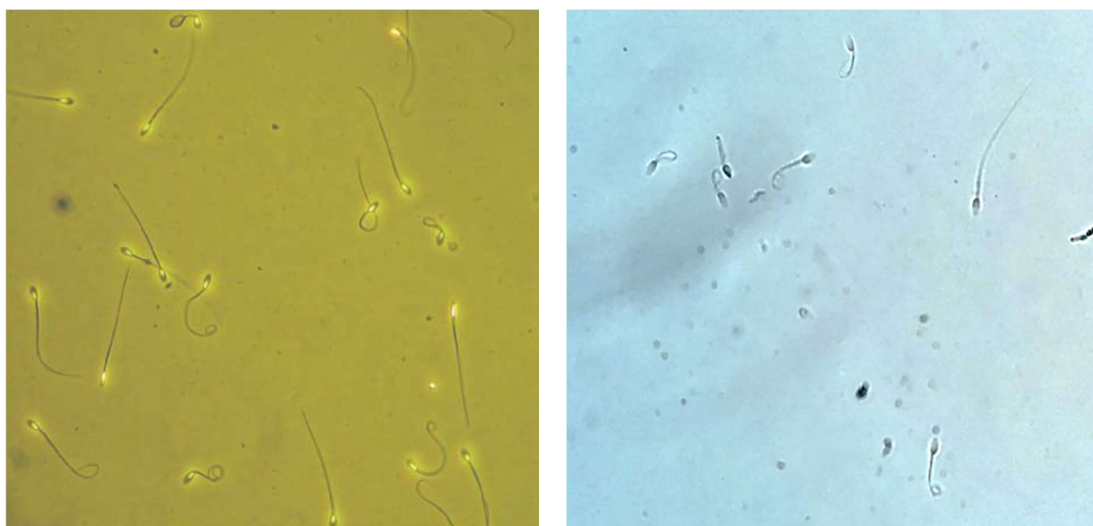
através da membrana lesada, o que permite a diferenciação entre células viáveis e não viáveis, embora menos específica que outras técnicas como as sondas fluorescentes (COLENBRANDER; GADELLA; STOUT, 2013).

Outro teste de fácil obtenção podendo ser realizado tanto em laboratório e a campo é o teste hiposmótico. Trata-se de uma prova bem simples que leva a célula espermática ao um estresse osmótico. O teste hiposmótico, além de avaliar se a membrana está intacta, avalia

também se há funcionalidade dessa membrana, fornecendo informações mais completas sobre a viabilidade celular (JEYENDRAN *et al.*, 1984).

Quando uma célula espermática é exposta a uma solução hiposmótica, as células funcionais absorvem a água, desencadeando um mecanismo de equilíbrio entre a solução e o meio. Assim, há a ingurgitação celular, pois, a água vai para o meio menos concentrado, levando a um inchaço característico. Essa pressão intracelular faz com que a haja o enrolamento da cauda desta forma podendo identificar as células lesionadas e não lesionadas. Os espermatozoides que não possuem a membrana íntegra não fazem troca osmótica, permanecendo com a cauda reta (COLENBRANDER; STOUT, 2011). A leitura é realizada em microscópio de contraste de fase com o aumento de 400 x, sendo realizada uma contagem

Figura 8. Teste hiposmótico



Teste realizado em microscópio de contraste de fase aumento de 400x. Cauda enrolada: membrana íntegra, cauda dobrada: membrana lesada. Fonte: arquivo pessoal e adaptado (COLENBRANDER; STOUT, 2011).

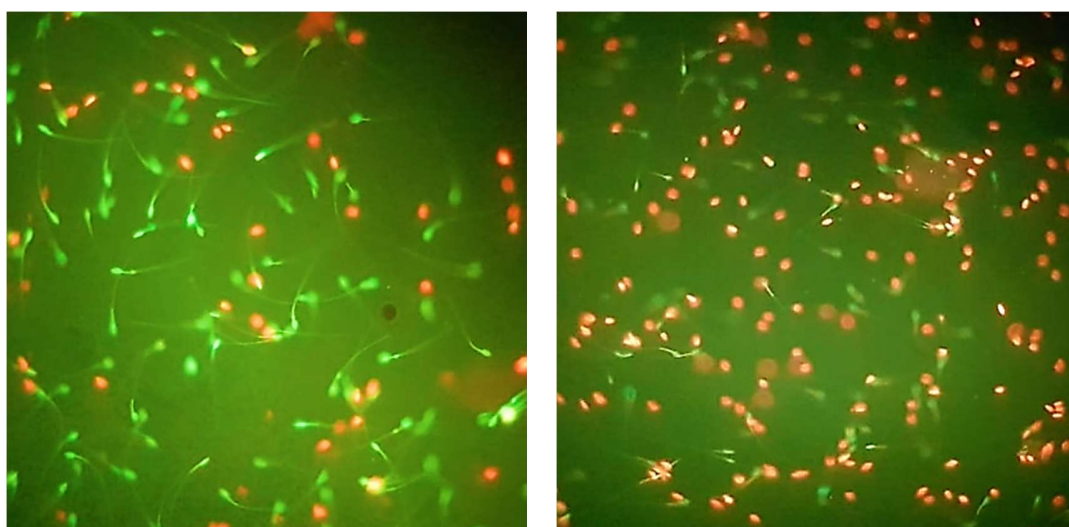
de 200 células espermáticas. O resultado é expresso em porcentagem de espermatozoides íntegros ou reativos ao teste osmótico (CBRA, 2013).

Para uma maior exatidão das avaliações da integridade da membrana plasmática se faz necessário o uso de sondas fluorescentes. Essa avaliação é superior aos demais testes citados anteriormente. Porém, apresenta como desvantagem que a sua realização só ocorre em laboratório, com aparelhos sofisticados (HARRISON; VICKERS, 1990; HARKEMA, 1992). As sondas fluorescentes, como o iodeto de propídio (PI) e o diacetato de

carboxifluoresceína (CFDA), isoladas ou associadas, possuem a capacidade de se ligarem e marcarem o DNA dos espermatozoides com membrana plasmática lesionada (SIEME, 2009), fornecendo assim, informações de quais células possuem a membrana íntegra usando diversos filtros (GILLAN *et al.*, 2005).

Quando realizada a combinação dos corantes iodeto de propídio e o diacetato de carboxifluoresceína, há o aumento da capacidade de identificação das células viáveis e inviáveis, é realizada a combinação entre corantes impermeabilizantes e permeabilizantes. Essa sonda (CFDA e PI) tem a capacidade de marcar o DNA de todas as células, sejam elas íntegras ou lesionadas. Quando o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) é usado em combinação com iodeto de propídio (PI), o espermatozoide é marcado de cor verde, indicando que o espermatozoide está íntegro. Quando o espermatozoide for marcado de

Figura 9. Sêmen de jumento corado com sondas fluorescentes



Iodeto de propídio (vermelho), células lesionadas. Fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (verde), espermatozoides íntegros. Foto: arquivo pessoal

vermelho ou vermelho-laranja, é indicativo que a células estão com a membrana plasmática danificada (GARNER *et al.*, 1994; GARNER; JOHNSON, 1995).

Outra análise de extrema importância para determinar a viabilidade dos espermatozoides é a através do potencial mitocondrial. A porcentagem de mitocôndrias funcionais normais tem correlação com a porcentagem de espermatozoides viáveis e móveis (GARNER *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 1998). Nos equídeos, foi observada uma relação entre a função mitocondrial e a motilidade da célula espermática, como também algumas características de velocidade (linearidade e retilinearidade) (LOVE *et al.*, 2003;

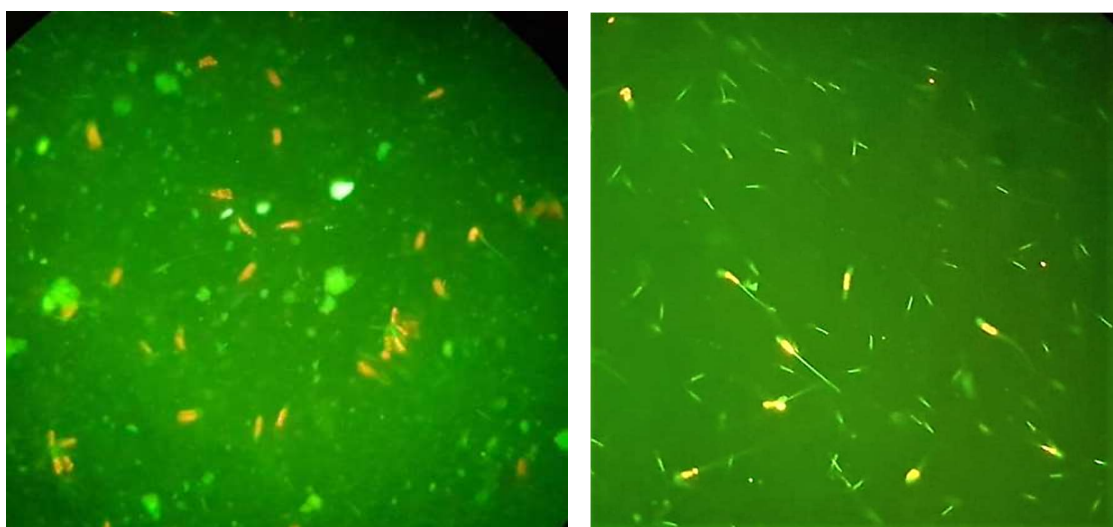
PAPAIOANNOU *et al.*, 1997). Existem algumas evidências em outras espécies, que a glicólise no flagelo represente uma fonte adicional de ATP para a função do axonema e a motilidade das células espermáticas (TURNER, 2006).

Os fluorocromos rodamina 123 (R123) e MitoTracker (MITO), sondas fluorescentes, foram utilizados para evidenciar a função mitocondrial dos espermatozoides, observando o potencial negativo através da membrana mitocondrial interna. Somente as mitocôndrias com atividade celular normal conseguem absorver esses corantes (GRAVANCE *et al.*, 2000a).

Todas as mitocôndrias funcionais são coradas de verde com fluorocromos de rodamina 123 (R123) e MitoTracker (MITO). O fluorocromo rodamina 123 (R123) não é adequado para uso em experimentos onde espermatozoides recebem fixadores de aldeído. A coloração mitocondrial iodeto de 5,5', 6,6'- tetracloro -1,1', 3,3'- tetraetilbenzimi-dazolil carbocianina (JC-1) permite a identificação dos espermatozoides com graus variados de função mitocondrial (SIEME, 2009).

O (JC-1) é um corante lipofílico catiônico que consegue penetrar em todas as mitocôndrias funcionais, em baixas concentrações está presente como monômero e apresenta coloração verde. Nas mitocôndrias com alta atividade funcional, as concentrações de (JC-1) penetram para dentro das células e a coração forma um conjunto de marcadores na cor laranja. Assim, a intensidade da fluorescência (JC-1) permite a seleção de espermatozoides com alto, moderado e baixo potencial de membrana mitocondrial por microscopia de fluorescência (GARNER; THOMAS, 1999; GRAVANCE *et al.*, 2000b).

Figura 10. Potencial mitocondrial de espermatozoides de jumento pós-descongelção



Monômero iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimi-dazolil carbocianina (JC-1).

Foto: arquivo pessoal

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criopreservação na espécie asinina ainda é um desafio, para tanto faz se necessário o enfoque nas pesquisas e no desenvolvimento de melhores práticas, metodologias e crioprotetores voltados para espécie asinina. A maioria das práticas utilizadas em jumentos são adaptações de outras espécies, como a espécie equina. Nos nossos levantamentos ficou claro que práticas usadas em equinos podem causar interferências nos resultados e na qualidade seminal de jumentos e possivelmente nas taxas de fertilidade. Os asininos possuem uma anatomia, fisiologia e comportamento sexual diferente dos equinos, portanto, subestimar essas diferenças é um dos maiores motivos de insucesso na reprodução de jumentos.

REFERÊNCIAS

- ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian sperm acrosome: Formation, contents, and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 379, n. 2, p. 173–182, 2000.
- ACHA, D. *et al.* Freezability of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: effect of extenders and permeating cryoprotectants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1990–1998, 2016.
- ALVAREZ, A. *et al.* **Proceedings of the 15th international congress animal reproduction.** Natural service and artificial insemination with cooled semen of Zamorano-Leones donkey. **Anais...**2004
- AMANN, R. P. Cryopreservation of sperm. In: ACADEMIC PRESS (Ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. 1. ed. New York: [s.n.]. p. 773–783.
- AMANN, R. P.; CRISTANELLI, M. J.; SQUIRES, E. L. Proteins in stallion seminal plasma. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 113–120, 1986.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal Function. In: **Equine Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 1054.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. R. The Epididymis and Sperm Maturation: a Perspective *. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. September 1992, p. 361–381, 1993.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA After 25 Years Andrology Lab Corner **Journal of Andrology**, v. 25, n. 3, p. 315–325, 2004.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Univ. de São Paulo., 2000.
- ARRUDA, R. P. *et al.* Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 17, p. 8–16, 2007.
- AURICH, J. E. *et al.* Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, n. 5, p. 791–797, 1996.
- BAAS, J. W.; MOLAN, P. C.; SHANNON, P. Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 68, n. 2, p. 275–280, 1983.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. Preparation of semen for morphological evaluation. In: **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. [s.l: s.n.]. p. 285.

BIELANSKI, W. Characteristics of the semen of stallions. Macro-and microscopic investigations with estimation of fertility. **Mem Acad Pol Sci Lettr**, v. 16, p. 1–58, 1951.

BIELAŃSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 39–45, 1979.

BLACH, E. L. *et al.* Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: Plasma membrane integrity and motion characteristic. **Theriogenology**, v. 58, n. 58, p. 99–104, 1989.

BOYD, L. E. The behaviour of Przewalski's horses and its importance to their management. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 29, n. 1–4, p. 301–318, 1991.

CABALLERO, I. *et al.* Does seminal plasma PSP-I/PSP-II spermadhesin modulate the ability of boar spermatozoa to penetrate homologous oocytes in vitro? **Journal of Andrology**, v. 25, p. 1004–1012, 2004.

CALVETE, J.; SANZ, L. Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins. **Society of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 65, p. 201–215, 2007.

CAMILLO, F. *et al.* The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 44–49, 2018.

CARNEIRO, G. F.; CAVALCANTE LUCENA, J. E.; DE OLIVEIRA BARROS, L. The Current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 106–110, 2018.

CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3. ed. Belo Horizonte: [s.n.].

COLENBRANDER, B. *et al.* Evaluation of the stallion for breeding. **Acta Veterinaria Scandinavica. Supplementum (Denmark)**, v. 29, n. 88, p. 37, 1992.

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, p. 305–311, 2013.

COLENBRANDER, B.; STOUT, T. Techniques for Evaluating Frozen Semen. In: **Equine Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 2996.

CUMMINS, J. M.; WOODALL, P. F. On mammalian sperm dimensions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 75, n. 1, p. 153–175, 1985.

DACHEUX, J.-L. *et al.* Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 319–341, 2005.

- DARENIUS, A. **Experiences with chilled, transported equine semen**. Stallion Reproduction Symposium. **Anais...**1998
- DARSZON, A. *et al.* T-type Ca²⁺ channels in sperm function. **Cell Calcium**, v. 40, n. 2, p. 241–252, 2006.
- DE ANDRADE, A. F. C. *et al.* Addition of Seminal Plasma to Post-thawing Equine Semen: What is the Effect on Sperm Cell Viability? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 682–686, 2011.
- DE OLIVEIRA LUCENA, C. A. *et al.* Influência da época do ano sobre os parâmetros seminais de garanhões pônei. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. SUPPL. 2, p. 178–179, 2014.
- DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 10149–10155, 1992.
- DIAS MAZIERO, R. R. *et al.* Evaluation of Sperm Kinetics and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Semen in Different Storage Volumes and Freezing Conditions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 165–168, 2013.
- DORADO, J. *et al.* Cryopreservation of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: Use of alternative energy sources in the freezing extender affects post-thaw sperm motility patterns but not DNA stability. **Animal Reproduction Science**, v. 208, n. May, p. 106126, 2019.
- DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential “life dead” stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, n. 3, p. 443–445, 1972.
- ELZANATY, S. *et al.* The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v. 17, n. 11, p. 2904–2911, 2002.
- FERRANTE, A. *et al.* Comparison of Whole and Centrifuged Egg Yolk Added to Kenney’s and Lactose-EDTA Extenders for Donkey Semen Cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, 2018.
- FRASER, L. R. *et al.* Fertilization - Calcium-dependent events [2]. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 6, p. 1258–1259, 1996.
- GARNER, D.; HAFEZ, E. Espermatozoides e Plasma Seminal. In: **Reprodução Animal**. [s.l.: s.n.]. p. 97.
- GARNER, D. L. *et al.* Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 6, p. 620–629, 1994.
- GARNER, D. L. *et al.* Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa1. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401–1406, 1997.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability Assessment of Mammalian Sperm Using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 2, p. 276–284, 1995.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, n. 2, p. 222–229, 1999.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–457, 2005.

GINSBERG, J. R.; RUBENSTEIN, D. I. Sperm competition and variation in zebra mating behavior. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 26, n. 6, p. 427–434, 1990.

GRAHAM, E. F.; SCHMEHL, M. L.; DEYO, R. C. M. **Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa**. Proceedings of the 10th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. **Anais...**1984

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 12, n. 1, p. 131–147, 1996.

GRAHM, J. K. Principles of Crypreservation. In: **Equine Reproduction**. 2. ed. Iowa: [s.n.]. p. 2960.

GRAVANCE, C. G. *et al.* Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 5–10, 2000a.

GRAVANCE, C. G. *et al.* Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1691–1703, 2000b.

GURAYA, S. S.; SIDHU, K. Cellular and Molecular Biology of Capacitation and Acrosome Reaction in Mammalian Spermatozoa. **International Review of Cytology**, v. 118, p. 231–280, 1989.

HAMMERSTEDT, H.; GRAHAM, K.; NOLAN, P. Cryopreservation What of Mammalian Sperm: We Ask Them to Survive other retrace. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73–88, 1990.

HAMMERSTEDT, R. O. Y. H.; GRAHAM, J. K.; CAROLINA, S. Cryopreservation of Poultry Sperm: The Enigma of Glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26–38, 1992.

HARKEMA, W. **Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa**. Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. **Anais...**1992

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.

HENRY, M. *et al.* **Características do sêmen de jumentos da raça Nordestina**. Proceedings of VII Braz Cong Anim Reprod. **Anais...**1987

HENRY, M. *et al.* Pasture mating behaviour of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 44, n. February 1989, p. 77–86, 1991.

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

HÖFNER, L.; LUTHER, A. M.; WABERSKI, D. The role of seminal plasma in the liquid storage of spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 2020.

HUNTER, R. H. F. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 63, n. 1, p. 109–117, 1981.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- IBGE. **Censo Agropecuário 2015**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agro 2017**, 2018. Disponível em:
<https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75642>. Acesso em: 16 out. 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. 41. ed. Rio de Janeiro, 2013.

JASKO, D. J. *et al.* Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1059–1067, 1991.

JASKO, D. J.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 3, p. 389–394, 1990.

JEYENDRAN, R. *et al.* Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219–228, 1984.

KAMARUDDIN, M. *et al.* Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. **Andrologia**, v. 36, n. 5, p. 327–334, 2004.

KLINGEL, H. Observations on social organization and behaviour of African and Asiatic Wild Asses (*Equus africanus* and *Equus hemionus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 103–113, 1998.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 629–636, 1994.

KRAUSE, D.; GROVE, D. Deep-freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet

form. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v. 14, n. c, p. 139–141, 1967.

KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Res Dev**, v. 20, p. 51–78, 1984.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A Molecular Membrane Model of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa. v. 224, p. 183–224, 1985.

LEAHY, T.; DE GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 207–213, 2012.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 759–778, 2011.

LOVE, C. C. *et al.* Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1127–1138, 2003.

MANN, T. Experimental approach to study of semen and male reproductive function. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 23, p. 133–137, 1978.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproductive Function and Semen**. 1. ed. London: Springer London, 1981.

MARENGO, S. R. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 52–63, 2008.

MARSHBURN, P. B. *et al.* Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, v. 58, n. 1, p. 179–186, 1992.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 47–51, 1979.

MAXWELL, W. M. C. *et al.* Seminal Plasma Effects on Sperm Handling and Female Infertility. **Society of Reproduction and Fertility**, v. 64 (1), p. 13–38, 2007.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1–4, p. 55–65, 1996.

MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and Membrane Integrity of Spermatozoa after Dilution and Flow Cytometric Sorting in the Presence or Absence of Seminal Plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 1165–78, 1997.

MCCUE, P. M.; SQUIRES, E. L. Cryopreservation of equine embryos. In: **Equine embryo transfer**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 91.

MCDONNELL, S. Reproductive behavior of the stallion. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 2, n. 3, p. 535–555, 1986.

MCDONNELL, S. M. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 277–282, 1998.

MCDONNELL, S. M. Normal Sexual Behavior. In: **Equine Reproduction**. 2^a ed. Ames: Blackwell Publishing Ltd, 2011. p. 1386–1390.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: Principles and practice. **Transfusion**, v. 47, n. 5, p. 935–945, 2007.

MEYERS, S. A. Sperm Physiology. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. [s.l: s.n.]. p. 49.

MIRÓ, J. *et al.* Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1706–1716, 2005.

MOEHLMAN, P. D. Behavioral patterns and communication in feral asses (*Equus africanus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 60, n. 2–3, p. 125–169, 1998.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372–2381, 2005.

MUIÑO-BLANCO, T.; PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.4, p. 18–31, 2008.

NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses**. Tokyo: Japan Racing Association. Tokyo: [s.n.].

NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y.; ONUMA, H. Studies on reproduction in asses. VII–Morphological studies of semen. **Bull Nat Inst Agric Sci Ser G.**, v. 1, p. 47–52, 1952.

OLIVEIRA, J. V. *et al.* New procedures to freeze donkey semen and its influence on mares and jennies fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 503–504, 2012.

OLIVEIRA, J. V. *et al.* Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1–4, p. 82–84, 2006.

PAPA, F. O. *et al.* Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3–4, p. 293–301, 2008.

PAPA, F. O. *et al.* **Manual de andrologia e manipulação de sêmen equino**. [s.l: s.n.].

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Sci Vet**, v. 33, n. 1, p. 19–27, 2005.

PAPAIOANNOU, K. Z. *et al.* Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using double staining and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 299–312, 1997.

PEÑA-ALFARO, C. E. *et al.* **VI Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal**.

FISIOLOGIA E BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ASININOS. **Anais...**Fortaleza: 2012

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 597–612, 2006.

PETRUNKINA, A. M. *et al.* Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. **Reproduction**, v. 134, n. 1, p. 3–17, 2007.

PIAO, S.; WANG, Y.; CHENG, Y. **A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination**. XI ICAR Meeting. Dublin: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. **Anais...**1988

PRATHALINGAM, N. S. *et al.* Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1894–1900, 2006.

ROBERTS, K. P. *et al.* Inhibition of Capacitation-Associated Tyrosine Phosphorylation Signaling in Rat Sperm by Epididymal Protein Crisp-11. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 2, p. 572–581, 2003.

ROTA, A. *et al.* Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1846–1854, 2012.

ROZAS, A. L. A. G. **Actuaciones para la conservación del asno zamorano-leonés. Inseminación artificial con semen refrigerado y congelado**. [s.l.] Facultad de Veterinaria–Universidad Complutense de Madrid, 2005.

SABATINI, C. *et al.* Effect of Post-Thaw Addition of Seminal Plasma on Motility, Viability and Chromatin Integrity of Cryopreserved Donkey Jack (*Equus asinus*) Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 989–994, 2014.

SANCHEZ, R.; GOMES, I.; SAMPER, J. Artificial Insemination with Frozen Semen. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. St. Louis: [s.n.]. p. 175.

SIEME, H. **Current status of cryopreservation of stallion spermatozoa**. Proceedings of the SIVE 13th Congresso Nazionale Multisala. **Anais...**Bologna: 2007

SIEME, H. Semen Evaluation. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. [s.l: s.n.]. p. 57.

SIEME, H. Semen Extenders for Frozen. In: **Equine Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 2964.

SIEME, H. Freezing Seme. In: **Equine Reproduction**. [s.l: s.n.]. p. 2978.

SILVA FILHO, J. M. *et al.* Utilização de manequim para coleta de sêmen eqüino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 16–18, 1999.

SOUZA, C. E. A. *et al.* Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and

osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 72–89, 2008.

SQUIRES, E. L. *et al.* **Biology and structure of spermatozoa and their response to cooling.** Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: Colorado State University Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin. **Anais...**1999

STABENFELDT, G.; EDQVIST, L.-E. Processos Reprodutivos do Macho. In: **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. [s.l: s.n.]. p. 603.

THOMAS, C. A. *et al.* Effect of Cryopreservation on Bovine Sperm Organelle Function and Viability As Determined by Flow Cytometry1. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 786–793, 1998.

TOMLINSON, M. *et al.* One-step disposable chambers for sperm concentration and motility assessment: how do they compare with the World Health Organization's recommended methods? **Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 121–124, 2001.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 793–806, 1998.

TROEDSSON, M. H. T. *et al.* Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1- 4 SPEC. ISS., p. 171–186, 2005.

TURNER, R. M. Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 1–2, p. 25–38, 2006.

VARNER, D. D. *et al.* Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 709–723, 1987.

VARNER, D.; VAUGHAN, S.; JOHNSON, L. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 2, p. 224–230, 1991.

VIDAMENT, M. *et al.* Centrifugation and addition of glycerol at 22 °C instead of 4 °C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 907–919, 2000.

VIDAMENT, M. *et al.* Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 1–2, p. 22–35, 2009.

VIEIRA, R. C.; ARRUDA, R. P.; MANZANO, A. **Inseminação intercornual de equídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL.** Anais XXII Reunião da SBZ. Balneário Camboriu, SC: SBZ. **Anais...**1985

VILÉS, K. *et al.* Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1–4, p. 57–63, 2013.

WATSON, P. **The effects of cold shock on sperm cell membranes. In 'Effects of Low Temperatures on Biological Membranes.** New York: [s.n.].

WATSON, P. F. *et al.* A comparison of Critical Osmolality and Hydraulic Conductivity and Its Activation Energy in Fowl and Bull Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 131–138, 1992.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871–891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

WITTE, T. S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 102, n. 3–4, p. 181–193, 2007.

WNUK, M. *et al.* Redox status of equine seminal plasma reflects the pattern and magnitude of DNA damage in sperm cells. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1677–1684, 2010.

YANAGIMACHI, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, v. 2, n. 4, p. 371–372, 1994.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico foi elaborado de acordo com as normas da Revista Theriogenology (Anexo A).

**AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE REMOÇÃO DO PLASMA SEMINAL E
TÉCNICAS DE CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN DE
JUMENTOS**

**R. A. Monteiro^a, R. M. Cunha^b, L. F. Batista^b, M. M. P. Guerra^c, V.M. Almeida^b, C. E.
Peña-Alfaro^b, S. V. Silva^{a,d}**

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, Brasil

^b Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Patos, Brasil

^c Universidade Federal Rural de Pernambuco, Campus Dois Irmãos, Recife, Brasil

^d Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa, Brasil

*Correspondência do autor

Tel.: +55 83 99629 8747

E-mail: rodrigo.monteiro@academico.ufpb.br

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar as técnicas de remoção do plasma seminal (PM) e os métodos de criopreservação (convencional e automatizado) de sêmen na espécie asinina. Foram utilizados três jumentos e dezoito ejaculados, colhidos por método de vagina artificial. Para remoção do plasma seminal, os ejaculados foram divididos em duas partes, sendo a primeira submetida à filtração e a segunda fração à centrifugação. Para avaliação do método de congelamento, cada fração pós-separação do PM e diluição, foi submetida tanto ao sistema automatizado (TK-3000®, curva P2S2), quanto ao sistema convencional (geladeira 5 °C/rampa em caixa de isopor). Foram formados, então, os seguintes grupos: automatizado centrifugado (MC), automatizado filtrado (MF), convencional centrifugado (RC) e convencional filtrado (RF). Após a descongelamento (37 °C/30”), foram realizadas as análises dos parâmetros cinéticos espermáticos pelo sistema computadorizado (CASA), integridade de membrana plasmática pela coloração eosina-nigrosina e sondas fluorescentes, teste hiposmótico e potencial mitocondrial. Os animais foram avaliados individualmente e após a constatação que não houve diferença entre os indivíduos, os dados foram agrupados por grupos experimentais. Nas avaliações observou-se maior concentração espermática ($P<0,05$) nos grupos filtrados (MF) e (RF); o grupo convencional filtrado (RF) apresentou menor ($P<0,05$) motilidade progressiva e velocidade curvilínea em relação aos demais grupos; não foi percebida diferença ($P>0,05$) entre os grupos para os testes de integridade de membrana, hiposmótico e potencial mitocondrial. Em conclusão, observa-se que a centrifugação é a técnica mais indicada para remoção do plasma seminal de jumentos e que os métodos de congelamento, automatizado e convencional, podem ser utilizados na criopreservação de sêmen de jumentos.

Palavras-chave: centrifugação; *Equus asinus*; espermatozoide; filtração.

30 1. Introdução

31 No Brasil, a exploração de produtos e subprodutos oriundos de asininos para
32 exportação é uma realidade; existem companhias voltadas para produção de carne e pele
33 desses animais, sendo esta produção exportada em sua totalidade para a China [1]. Por outro
34 lado, outros produtos como o leite de jumenta, não explorado no Brasil mas bem apreciado
35 no Mediterrâneo europeu, é uma alternativa bastante viável para pequenos e médios
36 produtores desta região, sendo a produção voltada em 40% para nutrição humana e em 60%
37 para produção de cosméticos [2].

38 A exploração desses animais pode ser alternativa viável para regiões semiáridas como
39 o nordeste brasileiro, visto que são animais que possuem adaptabilidade frente a escassez de
40 alimentos e água. Ao analisar essas condições previamente descritas, a técnica de
41 criopreservação de sêmen para a espécie asinina é uma biotécnica que possibilita a expansão
42 deste mercado, entretanto, a congelação de sêmen nesta espécie ainda não dispõe de
43 protocolo definido.

44 Estudos [3] atribuíram as baixas taxas de fertilidade do sêmen de jumento pós-
45 criopreservação a ação dos crioprotetores, no entanto as pesquisas em torno dessa tema são
46 pouco conclusivas.

47 Há necessidade de estudos voltados para avaliação das técnicas e métodos de
48 criopreservação na espécie asinina. É indispensável para o sucesso das técnicas o domínio
49 dos processos inerentes a criopreservação, como a remoção do plasma seminal, taxas de
50 refrigeração e congelação. Essas técnicas quando não realizadas de forma apropriada podem
51 causar danos irreversíveis as células espermáticas. Taxas de refrigeração e congelação
52 inadequadas resultam na formação de cristais de gelo intracelular [4].

53 Para asininos, há pesquisas que demonstram que a velocidade de redução de
54 temperatura, tanto na refrigeração quanto na congelação podem comprometer a integridade
55 e funcionalidade das membranas espermáticas. Segundo Oliveira e colaboradores [5], o
56 método automatizado seria o indicado para a criopreservação de sêmen nesta espécie, já
57 outros autores indicam o método convencional [6] [7].

58 A remoção do plasma seminal é outro ponto de extrema importância para o sucesso
59 da criopreservação, uma vez que um dos principais impactos negativos do plasma seminal é
60 a formação de EROS (Espécies Reativas de Oxigênio), que são agentes altamente reativos e

61 pertencentes à classe dos radicais livres [8].

62 Quantidades superiores a 10% de plasma seminal nas amostras de sêmen, na espécie
63 equina, causam efeitos negativos ao sêmen submetido à criopreservação, sendo atribuído a
64 participação do EROS, nesses casos [9]. A participação de EROS está associada a eventos
65 de fosforilação durante a capacitação espermática, podendo acelerar esse processo [10].

66 Pesquisas foram realizadas em diversas espécies, com o intuito de evidenciar a técnica
67 mais eficiente e prática para remoção do plasma seminal e consequentemente na seleção das
68 células espermáticas viáveis [11] [12]. Quando realizada a centrifugação em altas rotações,
69 foi constatado impactos negativos e diminuição na concentração espermática [13]. Em
70 jumentos foi observado que a centrifugação reduziu a proporção de espermatozoides rápidos,
71 podendo ser prejudicial para a criopreservação nessa espécie e afetar diretamente as taxas de
72 fertilidade [14].

73 Alternativas como o filtro de membrana pode ser viável para substituir a
74 centrifugação do plasma seminal em amostras de sêmen asinino. Uma vez que, trabalhos em
75 equinos, vêm apresentando benefícios no uso do filtro de membrana, como melhora na
76 concentração espermática e manutenção dos parâmetros cinéticos [15].

77 Baseado nestas variações para um protocolo de criopreservação de sêmen asinino, os
78 objetivos deste estudo foram (1) avaliar os efeitos da centrifugação e filtração na remoção do
79 plasma seminal antes da criopreservação e os possíveis danos causados por essas práticas nos
80 espermatozoides de jumentos, e (2) avaliar os métodos de criopreservação, convencional e
81 automatizado, e seus impactos nas células espermáticas de asininos.

82 2. Material e métodos

83 2.1 Animais e local do experimento

84 A experimentação foi previamente aprovada pela Comissão de Ética no Uso de
85 Animais (Protocolo CEUA nº 7312180618) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

86 O trabalho foi realizado entre os meses de janeiro e junho de 2019, no setor de
87 Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande
88 (UFCG), Patos, Brasil (altitude de 250 metros, 7°1'18" de latitude S e 37°2'75" de
89 longitude O). Foram usados três jumentos da raça Nordestina, saudáveis, com idades
90 entre dois a 15 anos, com histórico de fertilidade. Em todos os animais foram realizados
91 exame andrológico de acordo com o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de
92 Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [16]. Os animais foram
93 mantidos em baias individuais e alimentados diariamente com feno, ração, sal mineral e
94 água disponível *ad libitum*.

95 2.2 Procedimentos de colheita e manipulação do sêmen

96 Os animais foram submetidos às colheitas de sêmen previamente à
97 experimentação, com o intuito de eliminar células espermáticas degeneradas e estabilizar
98 os parâmetros espermáticos. Os ejaculados foram colhidos utilizando vagina artificial,
99 modelo Botucatu (Botupharma, Brasil); as colheitas foram realizadas com dois dias de
100 intervalos, totalizando 18 ejaculados, seis ejaculados de cada animal. Após a colheita, foi
101 removida a fração gel do ejaculado e realizada análises subjetivas, segundo as normas do
102 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal e quando aprovado, de acordo com os
103 parâmetros para sêmen equino (CBRA, 2013), o ejaculado foi fracionado em duas
104 alíquotas (25 mL) e adicionado diluente de refrigeração a base de leite desnatado
105 (BotuSemen, Botupharma), na proporção de 1:1 (volume:volume).

106 2.3 Remoção do plasma seminal por centrifugação

107 Para a remoção do plasma seminal foi realizada a centrifugação (Excelsa II 206,
108 FANEM), programada a velocidade de centrifugação com rotação de 600 x g por 10
109 minutos [15], sendo o sobrenadante descartado usando pipeta de *Pasteur*.

110

2.4 Remoção do plasma seminal por filtração

A remoção do plasma seminal por filtração foi realizada por um filtro de membrana hidrofílica sintética, com porosidade de 2µm por poros (SpermFilter®, Botupharma). O sêmen diluído em diluente a base de leite desnatado na proporção de 1:1 foi depositado sobre o filtro de membrana e realizados movimentos circulatorios sutis, sendo tocado suavemente em uma placa de Petri. Nesse processo, há uma passagem do plasma seminal através do filtro e os espermatozoides ficam retidos sobre o filtro de membrana.

Após o processo de remoção do plasma seminal, as amostras foram ressuspensas no diluidor de criopreservação (Botucurio®, Botupharma), identificadas e envasadas em palhetas de 0,5 mL, na concentração de 400×10^6 espermatozoides/mL.

As amostras foram identificadas e separadas de acordo com o sistema usado e a técnica de remoção do plasma seminal: método automatizado centrifugado (MC), método automatizado filtrado (MF), método convencional centrifugado (RC) e método convencional (RF).

2.5 Sistemas de congelação

No sistema automatizado, as amostras foram distribuídas no porta-palhetas da máquina de congelação (TK 3000, TK Tecnologia em Congelamento, Brasil), selecionada a curva P2.S2 (taxa de -0,25 °C por minuto até 5 °C, -10 °C por minuto até atingir -120,0 °C. Após a curva de congelamento, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de criogênio (-196 °C).

No método convencional, as palhetas foram distribuídas nas raques metálicas e submetidas à curva de refrigeração em refrigerador doméstico, na temperatura de 5 °C, por 20 minutos. Em seguida, as palhetas foram transferidas para uma caixa isotérmica de 37 L com 4 cm de nitrogênio líquido, as palhetas foram dispostas horizontalmente, em nível de 6 cm acima do nitrogênio, com taxa de congelamento de -10 °C por minuto, até alcançar -60 °C, em uma velocidade de -8 °C por minuto entre -60 °C e -100 °C, totalizando 20 minutos de curva de congelamento. Na sequência as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criogênico [17].

As palhetas foram descongeladas a 37 °C durante 30 segundos [18] e imediatamente as amostras foram transferidas para tubos plásticos cônicos de 1,5 mL. As amostras foram analisadas cinco minutos após a descongelamento (0h) e duas horas após

descongelação, mantidas na temperatura de 37 °C (2h), caracterizado o teste de termorresistência.

2.6 Avaliações pós-descongelação dos parâmetros cinéticos

Foram realizadas análises subjetivas, motilidade, vigor, pH, contração e morfologia espermática, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal [16]. Para as análises de morfologia espermática foram utilizados estiraços corados com eosina-nigrosina e analisada sob imersão, a um aumento de 1000x em microscópio contraste de fase (Olympus, Tóquio, Japão) sendo contadas 200 células e classificadas de acordo com os defeitos. Para avaliação da cinética espermática foi utilizado o sistema computadorizado de análise espermática – CASA (SCA™; Microptics, S.L., Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Uma alíquota (10 µL) da amostra foi diluída em 100 µL de PBS e colocada em lâmina pré-aquecida (37 °C).

Foram avaliadas, pelo método CASA, as seguintes variáveis: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), velocidade em linha reta (VSL; µm/s), velocidade média do percurso (VAP; µm/s), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), amplitude lateral da cabeça espermática (ALH) e batimento cruzado flagelar (BCF). Os valores do CASA foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura de 37 °C; magnificação de 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área de cabeça, 4 a 75 µm²; VAP: lentos 10 µm/s < médios 45 µm/s < rápidos 90 µm/s; progressividade, 75% STR, 50% LIN [19]; [20]; [21].

2.7 Avaliação das membranas espermáticas

A integridade de membrana plasmática foi avaliada pela coloração supra-vital eosina-nigrosina, sendo realizada coloração com 25 µL de sêmen + 25 µL de corante eosina-nigrosina. As amostras foram homogeneizadas e em seguida realizado o estiramento para leitura, sendo realizada em microscópio óptico e totalizando uma contagem de 200 células, onde os espermatozoides corados em tom rosáceo apresentam lesão membranar e os não corados, íntegros.

Outro procedimento realizado para observar integridade de membrana plasmática foi o método de dupla coloração utilizando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA; 0,46 mg/mL em DMSO) e iodeto de propídio (PI; 0,5 mg/mL em PBS). Foram adicionados 150 µL de PBS + 50 µL da amostra, que foram

coradas com 5,0 µL de CFDA e 5,0 µL de PI, incubada por cinco minutos a temperatura ambiente (25 °C) e posteriormente adicionados 5,0 µL de paraformaldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-630 nm. Espermatozoides com fluorescência em verde apresentaram integridade da membrana plasmática e os fluorescentes em vermelho indicaram membrana plasmática lesada.

A avaliação de funcionalidade da membrana plasmática foi realizada pelo teste hiposmótico, onde foi diluído 10 µL de cada amostra de sêmen + 100 µL de solução salina hiposmótica (100 mOsm), em sequência colocada em banho maria por 30 minutos a 37 °C e adicionado 50 µL de solução formol salino para parar a reação, sendo realizada a contagem de 200 células espermáticas por amostra. Os espermatozoides que apresentaram cauda enrolada indicaram membrana plasmática funcional, os que apresentaram cauda reta, indicaram membrana plasmática lesada.

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o monômero Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1; 0,15 mM em DMSO). Para cada tratamento, uma alíquota 50 µL da amostra foi corada com 5,0 µL de JC-1, incubada por cinco minutos e adicionados 5,0 µL de paraformaldeído. Ao total, 200 espermatozoides foram avaliados usando filtro de excitação DBP 485/20 nm e filtro de emissão de 580-630 nm. Os espermatozoides fluorescentes em laranja indicaram alto potencial mitocondrial, os fluorescentes em verde indicaram baixo potencial mitocondrial.

2.8 Análise Estatística

Para os dados estatísticos foi utilizado o pacote PAST (Paleontological Statistics, Versão 3.25, Oslo, Noruega) [22]. Os animais foram avaliados individualmente e após a constatação que não houve diferença entre os indivíduos, os dados foram agrupados por grupos experimentais. Primeiro, foi realizado o teste de normalidade (Shapiro-Wilk). Em sequência, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey. Para avaliação entre os tempos 0h e 2h de descongelação, o teste T foi realizado. Todos os testes consideraram significância de 5%.

3. Resultados

Os resultados referentes às avaliações subjetivas com sêmen fresco e sêmen descongelado estão dispostos na tabela 1. Estas primeiras análises não foram submetidas ao teste de termorresistência, só avaliadas no imediato momento da descongelação.

Na avaliação subjetiva, observou-se redução ($P<0,05$) da motilidade total e do vigor espermático após o processo de criopreservação, independente do grupo experimental. Na técnica de filtração foi observada maior recuperação ($P<0,05$) de células espermáticas quando comparada ao processo de centrifugação, visto que os grupos MF e RF tiveram maior concentração espermática que os MC e RC. O potencial hidrogeniônico foi reduzido ($P<0,05$) após o processo de criopreservação.

Não foi observada diferença ($P<0,05$) na morfologia espermática entre o sêmen fresco (SF) e sêmen descongelado (MC, MF, RC e RF).

Para as análises de integridade e funcionalidade de membrana, foi observada redução ($P<0,05$) nestes parâmetros seminais quando o sêmen asinino foi submetido ao processo de criopreservação, independente do grupo experimental.

Os resultados referentes aos parâmetros cinéticos estão dispostos na tabela 2. Não foi observada diferença ($P<0,05$) na MT entre os grupos tanto no tempo 0h, quanto no tempo 2h, no entanto, houve redução ($P<0,05$) da MT entre os tempos para todos os grupos. Já na MP, o grupo RF apresentou menor ($P<0,05$) MP no momento 0h, entretanto, esta diminuição ocorreu em todos os grupos no momento 2h.

O grupo MC apresentou menor ($P<0,05$) linearidade e retilinearidade que os demais grupos no momento 0h. Esta diferença não foi observada no momento 2h. Para o índice de oscilação, não foi observada diferença ($P>0,05$) entre os grupos experimentais.

Os demais parâmetros avaliados pelo CASA estão dispostos na tabela 3. O grupo RF apresentou menor ($P<0,05$) velocidade curvilínea que os demais grupos no tempo 0h. Após 2h de incubação, foi percebida redução acentuada ($P<0,05$) deste parâmetro para todos os grupos em comparação ao tempo 0h.

Para os parâmetros de velocidade em linha reta, velocidade média do trajeto e amplitude lateral da cabeça espermática não foi observada diferença entre os grupos nos tempos 0h e 2h, sendo observada apenas diferença entre os tempos 0h e 2h entre cada grupo

($P < 0,05$). Para o batimento cruzado flagelar, não houve diferença ($P > 0,05$) entre os grupos no tempo 0h, porém nos grupos centrifugados (MC e RC), foi percebida redução ($P < 0,05$) deste parâmetro após 2h de incubação.

Para as avaliações de integridade de membrana e potencial mitocondrial (tabela 4) foi evidenciado diferença ($P < 0,05$) entre os tempos 0h e 2h pós-descongelação em ambas as técnicas, entretanto, não houve diferença entre os grupos avaliados ($P > 0,05$).

Quando comparada as técnicas de avaliação de integridade de membrana por sondas fluorescentes ou eosina-nigrosina (tabela 5) não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre as médias no momento 0h.

4. Discussão

A criopreservação é uma técnica que permite a conservação de gametas por um período indeterminado, todavia, é sabido que este processo promove injúrias que reduzem a viabilidade celular. Esta constatação foi observada em nosso experimento, ao verificar redução de 30 a 40% da motilidade do sêmen fresco em comparação ao sêmen pós-descongelação. Em outros trabalhos foi observado uma redução de 40%, após a criopreservação [23]. Em protocolos de congelação usados na espécie asinina, essa redução ficou em torno de 40 a 50% [7].

Tal redução pode ser explicada devido ao processo de criopreservação, que expõem os espermatozoides a fatores prejudiciais como exposição a diluentes, refrigeração, congelação e descongelação, etapas estas que podem produzir danos e alterações irreversíveis aos espermatozoides [4]. Entretanto, é importante destacar que a redução pós-criopreservação encontrada em nosso estudo foi inferior ao relatado na literatura. Este menor impacto na redução da viabilidade do espermatozoide asinino à criopreservação pode estar associado ao melhor desenvolvimento de um protocolo de remoção do plasma seminal e método de refrigeração/congelação.

O processo de remoção do plasma seminal por filtração em sêmen de jumento apresentou maior recuperação de células espermáticas. Esses resultados divergem dos encontrados por Sieme [24] na espécie equina, que utilizou o filtro Leucosord®, um modelo usado para filtração de células sanguíneas. Ao comparar os filtros, ambos apresentam a mesma composição, sendo composta por material de membrana sintética hidrofílica. Porém,

o filtro Leucosord® apresenta maior espessura nos poros sendo 8,0 µm, o SpermFilter® apresenta 2,0 µm. O diâmetro dos poros foi determinante para obter uma maior recuperação de células espermáticas nas nossas pesquisas. O SpermFilter® é um modelo desenvolvido exclusivamente para células espermáticas, com poros de menor espessura, desta forma retendo maior número de células espermáticas.

Ainda sobre a recuperação espermática, nossos achados contrapõem-se aos encontrados por Alvarenga [15] em equinos, que avaliaram os efeitos das técnicas de filtração e centrifugação. Estes autores obtiveram uma menor recuperação de espermatozoides quando usado o filtro de membrana. A célula espermática dos asininos apresenta diferenças no seu tamanho quando comparada aos equinos. A cabeça do espermatozoide dos jumentos mede por volta de 10,86 µm, já equinos é 8,91 µm; a peça intermediária tem 9,9 µm nos jumentos e 9,8 µm nos cavalos; a cauda mede 47,3 µm nos asininos e 43,8 µm nos equinos. Desta forma, compõe-se uma medida total de 64,1 µm nos jumentos e 60,6 µm nos cavalos [25]. Existe uma correlação direta com o tamanho do espermatozoide e espessura dos poros no filtro de membrana, com maior retenção de células espermáticas, no filtro de membrana, devido o espermatozoide de jumentos possuírem maior tamanho que os espermatozoides equinos.

Quando realizada as análises mais detalhadas pelo sistema computadorizado CASA, os parâmetros cinéticos apresentaram diferenças nos valores médios. Nas avaliações subjetivas, há uma variação marcante nos parâmetros avaliados. Esta variação entre os resultados podem ser justificada, uma vez que as estimativas subjetivas dos parâmetros seminais podem sofrer influência de fatores como a experiência dos examinadores [20]. O CASA é uma ferramenta importante para fornecer informações exatas, dando respostas mais efetiva e completas para as análises do sêmen [26].

A motilidade progressiva e velocidade curvilínea apresentaram menores valores no grupo convencional filtrado (RF), no tempo 0 hora pós-descongelação. Nos nossos levantamentos foi observado que esse grupo apresentou maior concentração espermática. Esses achados correspondem com os levantamentos de Nascimento [27], que observaram uma redução nos parâmetros cinéticos (progressiva e velocidade curvilínea) à medida que foram aumentadas as concentrações espermáticas. É sabido que a baixa motilidade

progressiva pode ser um dos principais indicadores de danos criogênicos, ocasionando, consequentemente, baixa na fertilidade [10].

Assim, a técnica de filtração associada ao método convencional de congelação causou redução nos parâmetros cinéticos (motilidade progressiva e velocidade curvilínea) em sêmen asinino criopreservado, que pode ser justificado por uma menor quantidade de crioprotetores disponíveis devido à alta concentração celular, o que favorece a morte espermática nas condições de redução e restabelecimento da temperatura, como observado na espécie equina [28].

Por outro lado, a permanência do plasma seminal, em altos níveis, pode causar alterações e inviabilizar o sêmen de jumento. Observamos neste trabalho que os grupos filtrados, pelos os quais permaneceram por mais tempo exposto ao plasma seminal, apresentaram menor velocidade curvilínea e velocidade linear. Assim como foi observado na espécie equina, altos níveis de plasma seminal no sêmen equino, por volta de 20% de volume, foi prejudicial no processo de criopreservação e tornou o ambiente inapropriado para essa técnica. Foi observado que o sêmen equino exposto a temperatura ambiente, antes do processo de refrigeração e com a presença de plasma seminal, apresenta uma série de efeitos deletérios [29].

Tal condição deletéria pode ser associada aos componentes presentes nas frações do ejaculado, visto que as primeiras frações do plasma seminal são ricas em eletrólitos, que servem para a modificação do trato genital da fêmea e podem comprometer a viabilidade espermática por alterar o pH e induzir a capacitação precoce [30], fazendo com que haja uma aceleração das mudanças bioquímicas ocorridas na célula espermática anterior à criopreservação, resultando em menor motilidade pós-descongelação por ativação metabólica prévia.

Ainda, em relação à separação do plasma seminal, nossos resultados demonstram que a remoção de plasma seminal por centrifugação foi mais eficiente na preservação das características seminais de interesse pós-descongelação, quando comparada à técnica de filtração. Nossos achados contrapõem-se aos encontrados por Rota [14], que observaram efeito negativo da técnica de centrifugação em jumentos, constatando a redução da motilidade total e redução na proporção de espermatozoides rápidos. Rota e colaboradores [14] realizaram a centrifugação por 10 minutos, com rotação de 700 x g, enquanto que a

centrifugação realizada em nosso experimento ocorreu no mesmo tempo, mas a 600 x g. Ramires Neto [31] e Aurich [32] recomendaram que a centrifugação seja realizada no período de 10-15 minutos e na velocidade de 400-600 x g, visto que a intensidade da velocidade seria mais deletéria à célula que o tempo da centrifugação.

Nos nossos estudos o processo de criopreservação não causou maiores injúrias à morfologia espermática de jumentos. A criopreservação, no geral, não causaria maiores danos à morfologia de células espermáticas criopreservadas, no tocante à formação da célula, visto que a espermatogênese ocorre no testículo e é finalizada na maturação epididimária. A criopreservação, entretanto, pode causar danos às mitocôndrias e ao acrossoma, assim como alterações na cauda do espermatozoide [33].

A remoção do plasma seminal por filtração ou centrifugação, e os métodos de congelamento, convencional ou automatizado, apresentou danos à integridade e funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide de jumentos. Segundo [34] as membranas espermáticas podem permanecer intactas e funcionais mesmo após o processo de criopreservação, o que foi observado neste trabalho. Os testes realizados para avaliar a integridade da membrana plasmática, (eosina-nigrosina e sondas fluorescentes) e funcionalidade de membranas plasmática e mitocondrial (teste hiposmótico e potencial mitocondrial) mantiveram-se sem variações entre os grupos experimentais, levando ao entendimento que as técnicas empregadas não causaram danos intensos. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, em sêmen equino [35]; [15]; [31], na remoção de plasma seminal e Dias Maziero et al. [36], que observaram os métodos de congelamento, convencional e automatizado. Ferrante e colaboradores [37], encontraram resultados contrários, quando congelaram sêmen asinino no método convencional. Nesse trabalho foi observado média de 40,5% de motilidade total, 34,5% de motilidade progressiva.

Quanto aos métodos de criopreservação, automatizado e convencional, os grupos submetidos à congelamento no método convencional apresentaram parâmetros cinéticos inferiores, motilidade total e progressiva. Nossos achados coincidem com os encontrados por Oliveira et al. [5], que encontraram resultados semelhantes em jumentos, as médias de motilidade total e progressiva, foram inferiores no grupo convencional.

Em equinos observou-se resultados diferentes dos observados em jumentos, onde testaram o sistema com caixa de isopor (convencional) e máquina de congelamento (automatizado)

e não foi constatado redução nos parâmetros de motilidade total, progressiva e integridade de membrana [38; 39; 40]. Esses resultados divergentes podem ser explicados pelo fato dessas espécies apresentarem composição lipídica distinta. Os jumentos apresentam maior números de fosfolipídios na membrana plasmática, quando comparado aos equinos, apresentando diferenças marcantes entre equinos e asininos [41]. Esse maior número de fosfolipídios confere maior fluidez da membrana plasmática espermática, com consequente maior sensibilidade à peroxidação lipídica quando exposta a variações de temperaturas [42; 43]. Esses achados reforçam a necessidade de protocolos específicos para criopreservação de sêmen de jumentos.

O método convencional quando combinado à remoção do plasma seminal por filtração apresentou resultados insatisfatórios. É possível que no método automatizado as taxas de redução de temperatura sejam mais consistentes e regulares, quando comparadas ao método convencional. A congelação, quando realizada em refrigerador e caixa isotérmica, apresenta variações de temperaturas, podendo ocorrer falhas nas taxas de refrigeração e comprometer os parâmetros cinéticos.

5. Conclusão

Em conclusão, para remoção do plasma seminal, a centrifugação é um processo mais rápido, eficaz e seguro, desde de que seja realizada na rotação correta para a espécie asinina. A filtração usando SpermFilter® apresentou uma maior recuperação espermática em jumentos, porém essa técnica expõem o sêmen a fatores prejudiciais à criopreservação. O método de criopreservação automatizado é o indicado para espécie asinina por ser mais consistente na redução da temperatura. O sistema convencional pode ser uma alternativa viável para a congelação de sêmen asinino. No entanto, a combinação sistema convencional e filtração não é indicada para criopreservação de sêmen de jumentos.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Hospital Veterinário Universitário Prof. Ivon Macêdo Tabosa - Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Laboratório de Clínica e Reprodução Animal - LaCRA (UFCG) e ao Laboratório de Andrologia - ANDROLAB (UFRPE) pelo suporte e pela disponibilização da estrutura física para realização desse trabalho.

386 **Referências**

- 387 [1] Carneiro GF, Cavalcante Lucena JE, de Oliveira Barros L. The Current Situation and
388 Trend of the Donkey Industry in South America. *J Equine Vet Sci* 2018;65:106–10.
389 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.03.007>.
- 390 [2] Camillo F, Rota A, Biagini L, Tesi M, Fanelli D, Panzani D. The Current Situation
391 and Trend of Donkey Industry in Europe. *J Equine Vet Sci* 2018;65:44–9.
392 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.11.008>.
- 393 [3] Oliveira J V, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Jr JADA, Papa FO. Effect of
394 cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim Reprod Sci*
395 2006;94:82–4. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.04.010>.
- 396 [4] Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod*
397 *Sci* 2000;60–61:481–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3).
- 398 [5] Oliveira JV de, Oliveira PV de LF, Melo e Oña CM, Guasti PN, Monteiro GA, Sancler
399 da Silva YFR, et al. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey
400 semen. *Theriogenology* 2016;85:1267–73.
401 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.010>.
- 402 [6] Ortiz I, Dorado J, Morrell JM, Crespo F, Gosálvez J, Gálvez MJ, et al. *Theriogenology*
403 Effect of single-layer centrifugation or washing on frozen – thawed donkey semen
404 quality: Do they have the same effect regardless of the quality of the sample ?
405 *Theriogenology* 2015;84:294–300.
406 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.021>.
- 407 [7] Dorado J, Hidalgo M, Acha D, Ortiz I, Bottrel M, Azcona F, et al. Cryopreservation
408 of Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa: Use of alternative energy sources
409 in the freezing extender affects post-thaw sperm motility patterns but not DNA
410 stability. *Anim Reprod Sci* 2019;208:106126.
411 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106126>.
- 412 [8] Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: Rationale, significance,
413 and treatment. *Urol Clin North Am* 2002;29:817–27. [https://doi.org/10.1016/S0094-0143\(02\)00081-2](https://doi.org/10.1016/S0094-0143(02)00081-2).
- 415 [9] Len J, Beehan D, Eilts B, Ebrahimie E, Lyle S. Stallion Sperm Integrity After
416 Centrifugation to Reduce Seminal Plasma Concentration and Cool Storage for 4 days.
417 *J Equine Vet Sci* 2020;85:102819. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102819>.
- 418 [10] O’Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species modulate
419 independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. *Free*
420 *Radic Biol Med* 2006;40:1045–55.
421 <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.055>.
- 422 [11] Ritar AJ, Salamon S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in
423 the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the angora goat.
424 *Aust J Biol Sci* 1982;35:305–12. <https://doi.org/10.1071/BI9820305>.
- 425 [12] Graham JK. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated
426 spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*
427 1994;41:1151–62. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80037-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80037-8).
- 428 [13] Hoogewijs M, Rijsselaere T, De Vlieghe S, Vanhaesebrouck E, De Schauwer C,
429 Govaere J, et al. Influence of different centrifugation protocols on equine semen
430 preservation. *Theriogenology* 2010;74:118–26.
431 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.022>.

- [14] Rota A, Magelli C, Panzani D, Camillo F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiat donkey spermatozoa. *Theriogenology* 2008;69:176–85. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.003>.
- [15] Alvarenga MA, Papa FO, Carmo MT, Kievitsbosch T, Castro Chaves MMB, Ramires Neto C. Methods of Concentrating Stallion Semen. *J Equine Vet Sci* 2012;32:424–9. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.003>.
- [16] CBRA. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3rd ed. Belo Horizonte: 2013.
- [17] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'Aqua JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 2008;107:293–301. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.05.003>.
- [18] Rota A, Panzani D, Sabatini C, Camillo F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology* 2012;78:1846–54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.07.015>.
- [19] Jasko DJ, Lein DH, Foote RH. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:389–94.
- [20] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149–79. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1).
- [21] Nery IHA. EFEITO DA L-CARNITINA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE EQUINOS. Universidade Federal Rural de Perenambuco, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cya.2015.11.011>.
- [22] Hammer Ø, Harper DAT, D. RP. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontol Electron* 2001;v.4:9.
- [23] Kunkitti P, Chatdarong K, Suwimonteerabutr J, Nedumpun T, Johannisson A, Bergqvist A, et al. Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2017;185:148–53. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.014>.
- [24] Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R, et al. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. *Reprod Domest Anim* 2003;38:134–40. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00416.x>.
- [25] Cummins JM, Woodall PF. On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fertil* 1985;75:153–75. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0750153>.
- [26] Amann RP, Waberski D. Theriogenology Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology* 2014;81:5-17.e3. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>.
- [27] Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP. Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. *J Equine Vet Sci* 2008;28:351–8. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2008.04.010>.
- [28] Avanzi BR, Ramos RS, Nichi M, Fioratti EG, Dell'Aqua Junior JA, Wechster FS, Papa FO. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes

- concentrações espermáticas. *Vet Zootec* 2011 18:226-238.
- [29] Moore AI, Squires EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2005;63:2372–81. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.032>.
- [30] Kareskoski A, Reilas T, Andersson M, Katila T. Motility and Plasma Membrane Integrity of Spermatozoa in Fractionated Stallion Ejaculates after Storage. *Reprod Domest Anim* 2006;41:33–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00647.x>.
- [31] Neto CR, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell’aqua JA, Papa FO, et al. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *J Equine Vet Sci* 2013;33:40–3. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.04.008>.
- [32] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci* 2008;107:268–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015>.
- [33] Woolley DM, Richardson DW. Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fertil* 1978;53:389–94. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0530389>.
- [34] O’Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002;17:704–9. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.3.704>.
- [35] Alvarenga MA, Melo CM, Magalhães LCO, Papa FO. A new method to concentrate equine sperm. *Anim Reprod Sci* 2010;121:186–7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.142>.
- [36] Dias Maziero RR, Guasti PN, Monteiro GA, Avanzi BR, Hartwig FP, Lisboa FP, et al. Evaluation of Sperm Kinetics and Plasma Membrane Integrity of Frozen Equine Semen in Different Storage Volumes and Freezing Conditions. *J Equine Vet Sci* 2013;33:165–8. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.008>.
- [37] Ferrante A, Baca Castex C, Bruno S, Arraztoa C, Plaza J, Neild D, et al. Comparison of Whole and Centrifuged Egg Yolk Added to Kenney’s and Lactose-EDTA Extenders for Donkey Semen Cryopreservation. *J Equine Vet Sci* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.02.024>.
- [38] Vita B, Monteiro GA, Melo CM, Maziero RR, Carmo MT, Alvarenga MA, et al. Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec* 2019; 71:770–6. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10526>.
- [39] Papa F, Santos T, Macedo L. Influência da distância entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelamento sobre os parâmetros espermáticos de sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim* 2003;27:366–70.
- [40] Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008;108:298–308. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.08.014>.
- [41] Maria Manoela Barata de Castro Chaves. PERFIL LIPÍDICO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES “IN NATURA” E CRIOPRESERVADOS DE JUMENTOS E CAVALOS. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Faculdade Paulista de Veterinária e Zootecnia, 2015.
- [42] Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonjans F, Comhaire FH. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod* 1998;4:111–8. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.2.111>.

- 526 [43] Parks JE, Lynch D V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull,
527 stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992;29:255–66.
528 [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90024-V](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90024-V).
529

Tabela 1. Parâmetros espermáticos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento fresco e descongelado submetidos a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação

Parâmetros	SF	MC	MF	RC	RF
Motilidade (%)	84,4 $\pm$ 6,8 ^a	50,8 $\pm$ 18,2 ^b	54,4 $\pm$ 15,4 ^b	47,8 $\pm$ 18,0 ^b	50,6 $\pm$ 17,3 ^b
Vigor (0-5)	5 $\pm$ 0,4 ^a	3 $\pm$ 0,7 ^b	4 $\pm$ 0,7 ^b	4 $\pm$ 0,7 ^b	4 $\pm$ 0,7 ^b
Conc(10⁶) céls/mL	201 $\pm$ 105 ^a	188 $\pm$ 53 ^a	327 $\pm$ 111 ^b	209 $\pm$ 64 ^a	358 $\pm$ 76 ^b
pH (1-14)	8 $\pm$ 0,5 ^a	6 $\pm$ 0,5 ^b	7 $\pm$ 0,5 ^b	7 $\pm$ 0,5 ^b	7 $\pm$ 0,5 ^b
Morfologia (%)	2,4 $\pm$ 1,5 ^a	3,2 $\pm$ 2,4 ^a	2,3 $\pm$ 1,5 ^a	2,1 $\pm$ 1,3 ^a	2,7 $\pm$ 1,5 ^a
IMP (%)	84,5 $\pm$ 7,2 ^a	40,4 $\pm$ 4,6 ^b	39,4 $\pm$ 4,3 ^b	39,6 $\pm$ 4,8 ^b	41,8 $\pm$ 3,6 ^b
FMP (%)	71,7 $\pm$ 13,6 ^a	58,8 $\pm$ 3,9 ^b	60,0 $\pm$ 5,2 ^b	60,2 $\pm$ 3,8 ^b	60,4 $\pm$ 3,6 ^b

^{ab}Letras diferentes nas linhas indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos. SF: sêmen fresco; MC: sêmen descongelado automatizado centrifugado; MF: sêmen descongelado automatizado filtrado; RC: sêmen descongelado convencional centrifugado; RF: sêmen descongelado convencional filtrado; IMP: integridade de membrana plasmática; FMP: funcionalidade de membrana plasmática.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento descongelado e submetido a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação

Grupos		MT (%)	MP (%)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)
0h	MC	40,3 ± 1,3 ^a	17,7 ± 7,0 ^a	66,1±15,7 ^a	84,7 ± 7,3 ^a	82,4 ± 4,2 ^a
	MF	40,2±12,8 ^a	14,5± 12,5 ^a	62,3±14,3 ^a	82,0 ± 6,6 ^a	81,7 ± 5,2 ^a
	RC	37,0 ± 8,2 ^a	14,2 ± 0,8 ^a	65,1±11,3 ^a	84,1 ± 4,9 ^a	76,8 ± 12,0 ^a
	RF	31,5 ± 4,4 ^a	9,8 ± 3,4 ^c	62,8±11,4 ^a	82,5 ± 6,6 ^a	72,9 ± 10,3 ^a
2h	MC	8,9 ± 2,1 ^b	1,4 ± 0,2 ^b	49,8 ± 3,3 ^b	65,5 ± 4,9 ^b	77,0 ± 8,6 ^a
	MF	9,8 ± 4,0 ^b	1,5 ± 0,7 ^b	56,7±5,4 ^a	74,4 ± 1,1 ^a	75,2 ± 6,6 ^a
	RC	6,5 ± 1,6 ^b	2,0 ± 1,0 ^b	57,6 ± 5,5 ^a	75,0 ± 2,7 ^a	75,9 ± 5,4 ^a
	RF	5,0 ± 1,2 ^b	1,6 ± 1,8 ^b	56,2 ± 5,8 ^a	77,0 ± 3,6 ^a	72,5 ± 5,1 ^a

^{abc}Letras diferentes nas colunas indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos. MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação. Grupos: MC (automatizado centrifugado), MF (automatizado filtrado), RC (convencional centrifugado) e RF (convencional filtrado).

Tabela 3. Parâmetros velocimétricos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento descongelado e submetido a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação

	Grupos	VCL (μm/s)	VSL (μm/s)	VAP (μm/s)	ALH (μm)	BCF (Hz)
0h	MC (T0)	64,6 ± 7,8 ^a	43,7 ± 15,0 ^a	50,8 ± 13,9 ^a	2,9 ± 0,7 ^a	9,3 ± 0,9 ^a
	MF (T0)	56,7 ± 14,3 ^a	36,5 ± 16,9 ^a	43,1 ± 16,9 ^a	2,9 ± 0,6 ^a	9,8 ± 1,0 ^a
	RC (T0)	62,0 ± 6,8 ^a	41,1 ± 9,6 ^a	48,3 ± 9,0 ^a	2,8 ± 0,6 ^a	9,9 ± 1,1 ^a
	RF (T0)	51,8 ± 4,4 ^c	33,2 ± 8,8 ^a	39,7 ± 7,4 ^a	2,6 ± 0,5 ^a	9,4 ± 0,7 ^a
2h	MC (T2)	29,2 ± 4,0 ^b	16,2 ± 1,3 ^b	22,3 ± 1,0 ^b	1,1 ± 0,5 ^b	4,8 ± 2,1 ^b
	MF (T2)	30,1 ± 5,6 ^b	17,6 ± 1,3 ^b	22,6 ± 2,5 ^b	1,5 ± 0,8 ^b	6,3 ± 4,3 ^a
	RC (T2)	31,6 ± 5,2 ^b	16,8 ± 3,7 ^b	24,0 ± 2,2 ^b	1,2 ± 0,5 ^b	5,9 ± 3,0 ^b
	RF (T2)	33,5 ± 5,8 ^b	19,0 ± 2,5 ^b	24,2 ± 2,9 ^b	1,7 ± 0,5 ^b	7,0 ± 3,1 ^a

^{abc}Letras diferentes nas colunas indica diferença ($P < 0,05$) entre os grupos. VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade linear, VAP: velocidade de trajeto, ALH: amplitude de batimento de cabeça, BCF: frequência de

batimento de cabeça. Grupos: MC (automatizado centrifugado), MF (automatizado filtrado), RC (convencional centrifugado) e RF (convencional filtrado).

Tabela 4. Integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen de jumento descongelado e submetido a diferentes práticas de remoção do plasma seminal e técnica de criopreservação

Grupos	Integridade de Membrana (%)		Alto Potencial Mitocondrial (%)	
	0h	2h	0h	2h
MC	46,2 $\pm$ 18,3 ^a	19,9 $\pm$ 8,8 ^b	50,2 $\pm$ 17,3 ^a	18,3 $\pm$ 17,7 ^b
MF	35,5 $\pm$ 16,5 ^a	21,9 $\pm$ 12,0 ^b	45,8 $\pm$ 17,7 ^a	23,3 $\pm$ 22,2 ^b
RC	47,3 $\pm$ 20,3 ^a	21,8 $\pm$ 17,4 ^b	46,4 $\pm$ 16,9 ^a	26,2 $\pm$ 17,6 ^b
RF	43,8 $\pm$ 16,6 ^a	18,4 $\pm$ 11,9 ^b	45,6 $\pm$ 17,6 ^a	22,4 $\pm$ 17,3 ^b

^{abc}Letras diferentes nas colunas e linhas indicam diferença ($P < 0,05$). Grupos: MC (automatizado centrifugado), MF (automatizado filtrado), RC (convencional centrifugado) e RF (convencional filtrado).

Tabela 5. Análise comparativa (média $\pm$ desvio padrão) entre as técnicas de avaliação de integridade de membrana plasmática de sêmen de jumento criopreservado por dupla coloração simples (eosina-nigrosina) e dupla coloração por fluoróforos (diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo) no tempo 0h

Grupos	Eosina-nigrosina (%)	Sondas Fluorescentes (%)
MC	40,4 $\pm$ 4,6 ^a	46,2 $\pm$ 18,3 ^a
MF	39,4 $\pm$ 4,3 ^a	35,5 $\pm$ 16,5 ^a
RC	39,6 $\pm$ 4,8 ^a	47,3 $\pm$ 20,3 ^a
RF	41,8 $\pm$ 3,6 ^a	43,8 $\pm$ 16,6 ^a

^{ab}Letras diferentes nas colunas indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos experimentais. Grupos: MC (automatizado centrifugado), MF (automatizado filtrado), RC (convencional centrifugado) e RF (convencional filtrado).

APÊNDICE A – CERTIDÃO DE APROVAÇÃO DA CEUA/UFPB



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Resolução



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação das práticas de criopreservação sobre espermatozoides de jumento (*Equus asinus*)", protocolada sob o CEUA nº 7312180618 (ID 000305), sob a responsabilidade de **Sildivane Valcácia Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 17/07/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of cryopreservation techniques on donkey spermatozoa (*Equus asinus*)", utilizing 4 Equines (3 males and 1 females), protocol number CEUA 7312180618 (ID 000305), under the responsibility of **Sildivane Valcácia Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 07/17/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de 07/2018 a 12/2019

Área: **Ciências Veterinárias**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 10 anos**

N: **3**

Linhagem: **Equus asinus**

Peso: **100 a 200 kg**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Equídeos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 3 anos**

N: **1**

Linhagem: **Equus asinus**

Peso: **100 a 200 kg**

Local do experimento: A parte inicial de preparação dos animais acontecerá no Haras Santa Clara, assim como a colheita do sêmen para o experimento. Os animais pertencem ao local. A parte de avaliação do sêmen acontecerá no estabelecimento e posteriormente no Laboratório de Andrologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

João Pessoa, 19 de fevereiro de 2020

Profa. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba